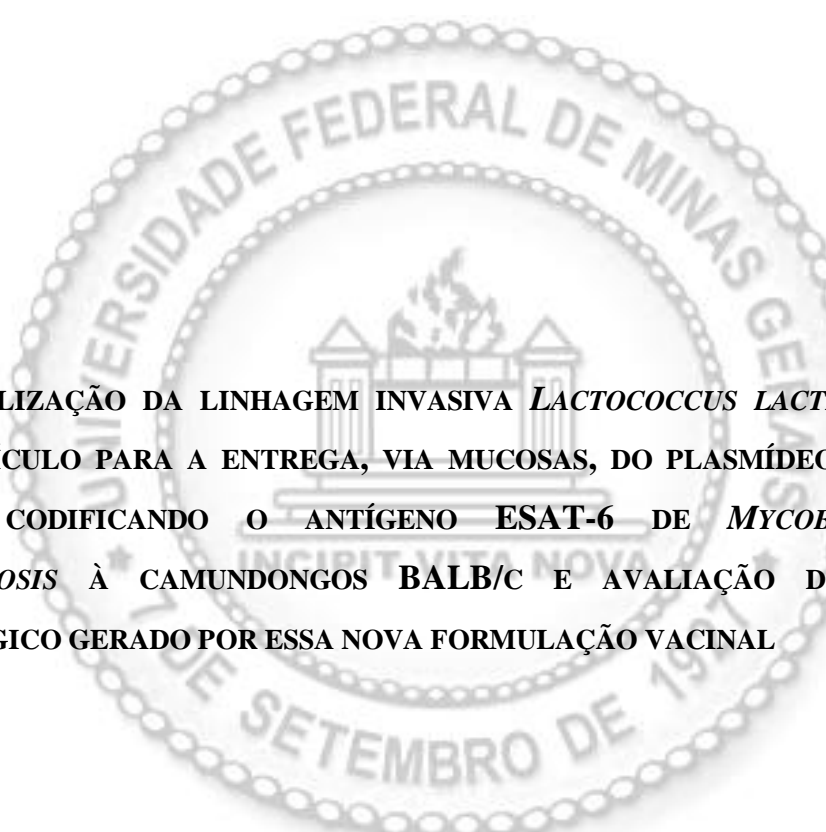


TESE DE DOUTORADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



UTILIZAÇÃO DA LINHAGEM INVASIVA *LACTOCOCCUS LACTIS* FNBPA
COMO VEÍCULO PARA A ENTREGA, VIA MUCOSAS, DO PLASMÍDEO VACINAL
PVALAC CODIFICANDO O ANTÍGENO ESAT-6 DE *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS À CAMUNDONGOS BALB/C E AVALIAÇÃO DO PERFIL
IMUNOLÓGICO GERADO POR ESSA NOVA FORMULAÇÃO VACINAL

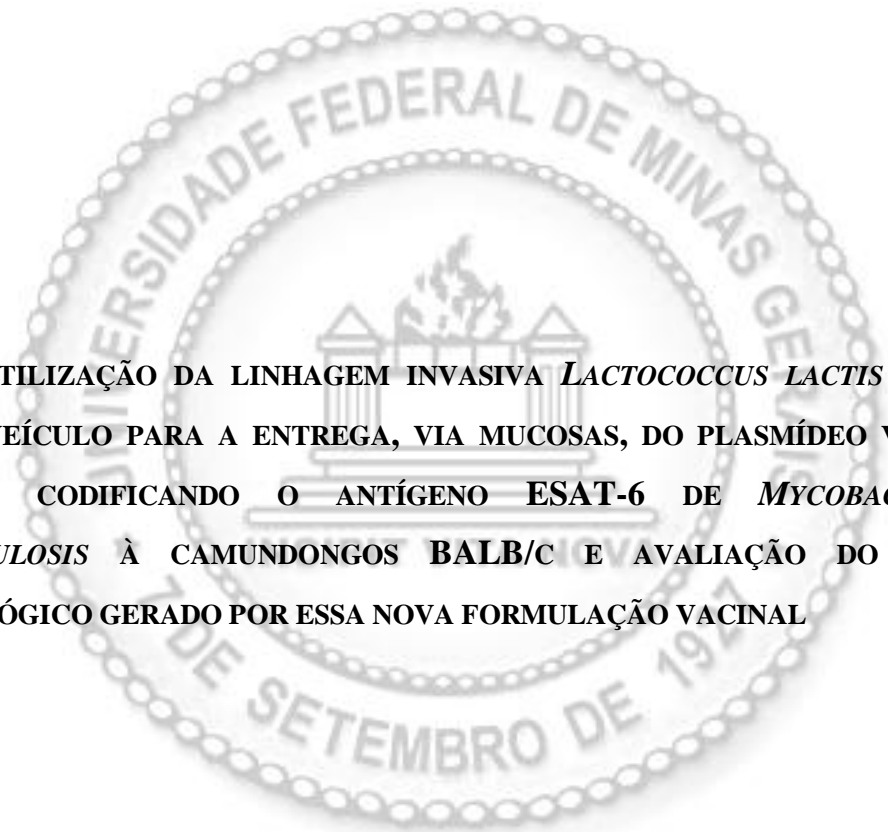
ORIENTADA: VANESSA BASTOS PEREIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. ANDERSON MIYOSHI

BELO HORIZONTE – MG

JULHO - 2014

VANESSA BASTOS PEREIRA



**UTILIZAÇÃO DA LINHAGEM INVASIVA *LACTOCOCCUS LACTIS* FNBPA
COMO VEÍCULO PARA A ENTREGA, VIA MUCOSAS, DO PLASMÍDEO VACINAL
PVALAC CODIFICANDO O ANTÍGENO ESAT-6 DE *MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS* À CAMUNDONGOS BALB/C E AVALIAÇÃO DO PERFIL
IMUNOLÓGICO GERADO POR ESSA NOVA FORMULAÇÃO VACINAL**

**Tese de doutorado apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Genética,
Departamento de Biologia Geral, Instituto de
Ciências Biológicas, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em
Genética pela Universidade Federal de Minas.**

ORIENTADOR: PROF. DR. ANDERSON MIYOSHI

BELO HORIZONTE – MG

JULHO - 2014

*Viver é como andar de bicicleta:
É preciso estar em constante movimento
para manter o equilíbrio.
(Albert Einstein)*

AGRADECIMENTOS

Prof. **Dr. Anderson Miyoshi** pela grande oportunidade, orientação e confiança depositada em mim. Muito obrigada!

Prof. **Dr. Vasco Azevedo** pelo apoio, incansável motivação e pela confiança.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida e a FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À coordenação, professores e colegas do curso de **Pós-Graduação em Genética** do ICB-UFMG.

Aos amigos do **LGCM** que fizeram cada dia de trabalho mais especial: Fernanda Dorella, Thiago, Siomar, Kátia, Luís, Núbia, Clarissa, Camila Prósperi, Fernanda Magalhães, Dayane, Síntia, Rodrigo, Camila Azevedo, Vinícius, Rachid, Edson, Tatiana, Edgar, Anderson Santos, Priscila, Leandro, Alberto, Eudes, Flávia Aburjaile, Amijad, Hassan, Nataíme, Lucas, Letícia, Diego, Karina, Mariana, Carlos, dentre outros.

Em especial aos **amigos** Marcela, Anne, Tessália, Cassiana, Renata, Meryxtell, Wanderson, Alfonso, Flávia e Bianca, que estiveram sempre presentes, tornando mais importante cada dia de trabalho.

Aos amigos do **LIB**, que me apoiaram e me deram grande força, em especial a **Dr. Ana Cristina Gomes Santos** pelas importantes recomendações e discussões e à **Prof. Dr. Ana Maria Caetano de Faria** pela colaboração.

Aos meus **Pais** pelo amor e dedicação, de longe sempre torcendo e incentivando. A minha mãe pelo carinho e ao meu pai pela compreensão e conselhos para toda vida. Ao meu irmão pela alegria de sempre.

Ao meu marido **Leonardo** pelo amor, companheirismo e alegria de viver. Muito obrigada!

E a **Deus**, acima de tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMO	1
ABSTRACT	2
I. APRESENTAÇÃO	4
I.1 Colaborações	4
I.2 Introdução Geral.....	4
I.3 Estrutura da tese	7
II. INTRODUÇÃO.....	9
II.1 Vacinas de DNA	9
II.1.1 Estrutura do plasmídeo para uso como vacina de DNA	10
II.1.1.1 Otimização do plasmídeo e do inserto para uso como vacina de DNA.....	12
II.1.2 Barreiras para a entrega das vacinas de DNA.....	13
II.1.3 Vias de administração para as Vacinas de DNA	14
II.1.3.1 A imunidade associada à mucosa intestinal.....	15
II.1.3.2 Utilização de bactérias para a entrega de vacinas de DNA.....	23
II.1.3.3 Bactérias patogênicas utilizadas para a entrega de vacinas de DNA	26
II.2 Bactérias Lácticas	27
II.2.1 Características das Bactérias Lácticas	27
II.2.2 <i>Lactococcus lactis</i> : a bactéria láctica modelo.....	28
II.2.3 Utilizações biotecnológicas de <i>Lactococcus lactis</i>	28
II.2.3.1 Produção de proteínas em <i>Lactococcus lactis</i>	29
II.2.3.2 <i>Lactococcus lactis</i> como vacinas vivas de mucosas	30
II.2.3.3 <i>Lactococcus lactis</i> como carreador de vacinas gênicas	31
II.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e a Tuberculose	34
II.3.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
II.3.2 Patologia e imunologia da doença	35
II.3.3 Epidemiologia da Tuberculose	39
II.3.4 Diagnóstico e tratamento	40
II.3.5 Profilaxia da doença: <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	42
II.3.6 Vacinas contra a tuberculose em desenvolvimento	44
II.4 A família ESAT-6	45
II.4.1 ESAT-6 como um antígeno vacinal.....	47
II.4.2 Vacinas em desenvolvimento utilizando ESAT-6	48
III. OBJETIVOS	54
III. 1 Objetivo Geral	54
III.2 Objetivos Específicos	54
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
IV.1 Considerações gerais	56
IV.1.1 Linhagens bacterianas, plasmídeos, condições de cultivo e estocagem.....	56

IV.1.2 Manipulação do DNA	59
IV.1.3 Resolução Eletroforética	59
IV.2 Construção da linhagem <i>L. lactis</i> MG1363(pValac:ESAT-6)	60
IV.2.1 Transformação da linhagem selvagem <i>L. lactis</i> MG1363 com o plasmídeo pValac:ESAT-6	60
IV.2.1.1 Confeção de células eletrocompetentes de <i>L. lactis</i> MG1363	60
IV.2.1.2 Transformação de <i>L. lactis</i> MG1363 com o plasmídeo pValac:ESAT-6 ..	61
IV.2.1.3 Extração do DNA plasmideano de <i>L. lactis</i> MG1363(pValac:ESAT-6) ..	61
IV.2.1.4 Confirmação dos clones <i>L. lactis</i> MG1363 portadores do plasmídeo pValac:ESAT-6	62
IV.2.2 Curva de crescimento das linhagens de <i>L. lactis</i>	63
IV.2.3 Ensaio de Viabilidade Bacteriana após sua passagem pelo trato intestinal	64
IV.2.4 Ensaio de translocação bacteriana para o fígado.....	64
IV.3 Clonagem, expressão e purificação da proteína ESAT-6 recombinante	64
IV.3.1 Amplificação da ORF ESAT-6	64
IV.3.2 Clonagem da ORF ESAT-6 no vetor de expressão pBAD202/D-TOPO®. 66	
IV.3.2.1 Confeção de <i>Escherichia coli</i> eletrocompetente	67
IV.3.2.2 Ligação da ORF ESAT-6 no vetor pBAD202/D-TOPO® e Transformação de <i>Escherichia coli</i> TOP10.....	68
IV.3.2.3 Extração do DNA plasmideano de <i>Escherichia coli</i> TOP10	69
IV.3.2.4 Confirmação da presença e do peso molecular da ORF ESAT-6 no vetor pBAD202/D-TOPO®.	69
IV.3.2.5 Reação de sequenciamento e análises em sílico.....	70
IV.3.3 Indução da expressão da proteína ESAT-6 a partir do vetor pBAD:ESAT-6	71
IV.3.4 Cinética da expressão da proteína ESAT-6 em <i>E. coli</i> (pBAD:ESAT-6)	72
IV.3.5 Avaliação da solubilidade da proteína ESAT-6 e padronização da concentração de uréia para purificação	72
IV.3.6 Purificação da proteína ESAT-6.....	73
IV.3.7 Confirmação do peso molecular e pureza da proteína recombinante ESAT-6 purificada pelo método de Nitrato de Prata	74
IV.3.8 Imunodeteção da proteína recombinante ESAT-6 por <i>Western Blotting</i> e ELISA	74
IV.3.9 Quantificação da proteína recombinante ESAT-6 pelo método de Bradford	75
IV.4 Caracterização das linhagens <i>L. lactis</i> em cultura de macrófagos	75
IV.4.1 Obtenção de células da medula óssea de camundongos C57BL/6.....	75
IV.4.2 Diferenciação de células da medula óssea de camundongos em macrófagos	76
IV.4.3 Cocultura de macrófagos com as diferentes linhagens de <i>L. lactis</i>	76
IV.4.4 Detecção das citocinas IL-10, IL-12, IL-6 e TNF- α após ensaio de cocultura com macrófagos.....	77
IV.5 Ensaios de imunização com as linhagens de <i>L. lactis</i> e avaliação da resposta imunológica	77
IV.5.1 Animais utilizados para a imunização.....	77
IV.5.2 Imunização de camundongos BALB/c com as linhagens de <i>L. lactis</i>	78
IV.5.3 Processamento do soro, fezes e cólon para dosagem de anticorpos.....	79
IV.5.4 Processamento do baço para cultura de células e dosagem de citocinas....	80
IV.5.5 Caracterização do Perfil da Resposta Imune Humoral.....	80
IV.5.5.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos.....	80

IV.5.6 Caracterização do perfil da resposta imune celular	81
IV.5.6.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas	81
IV.5.7 Detecção de células TCD4+ e TCD8+ produtoras de IFN- γ através de citometria de Fluxo	82
IV.5.8 Análises estatísticas	83
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
V.1 Construção da linhagem <i>L. lactis</i> MG1363(pValac:ESAT-6).....	85
V.1.1 Estabelecimento das doses vacinais a serem utilizadas nos experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	86
V.1.2 Ensaio de viabilidade bacteriana na passagem pelo trato intestinal	88
V.1.3 Ensaio de Translocação bacteriana para o fígado	89
V.2 Clonagem, expressão e purificação da proteína ESAT-6 recombinante	89
V.2.1 Clonagem da ORF ESAT-6 no vetor de expressão pBAD202/D-TOPO® ..	90
V.2.2 Indução da expressão da proteína rESAT-6 a partir do vetor pBAD:ESAT-6	92
V.2.3 Avaliação da solubilidade da proteína rESAT-6 e padronização da concentração de uréia para purificação	94
V.2.4 Purificação da proteína ESAT-6 em FPLC	96
V.3 Caracterização do perfil imunológico gerado pelas linhagens de <i>L. lactis</i> em cultura de macrófagos.....	98
V.4 Avaliação do perfil imunológico após a imunização de camundongos BALB/c com as linhagens de <i>L. lactis</i>	101
V.4.1 Caracterização do perfil da resposta imune celular	102
V.4.1.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-12 nos esplenócitos dos animais imunizados com as diferentes linhagens de <i>L. lactis</i>	103
V.4.1.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem das citocinas IL-10 e IL-4 nos esplenócitos dos animais imunizados com as diferentes linhagens de <i>L. lactis</i>	105
V.4.2 Caracterização do Perfil da Resposta Imune Humoral	107
V.4.2.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de sIgA no cólon e nas fezes.....	107
V.4.2.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem dos anticorpos IgA, IgG, IgG1 e IgG2a séricos	110
V.4.3 Análise de células TCD4+ e TCD8+ produtoras de IFN- γ	114
VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	118
VI.1 Conclusão geral	118
VI.2 Conclusões específicas	118
VI.3 Perspectivas	119
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
VIII. ANEXOS	156

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM PLASMÍDEO PARA USO COMO VACINA DE DNA.....	11
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ELEMENTOS LINFÓIDES DO SISTEMA IMUNE INTESTINAL.....	17
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PROTEÇÃO DA SUPERFÍCIE DE MUCOSAS.....	20
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS DE VACINAS DE DNA POR BACTÉRIAS ÀS CÉLULAS MAMÍFERAS.....	24
FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PROCESSOS ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO, NO CURSO DA DOENÇA E NOS MECANISMOS IMUNES ATIVADOS DURANTE A INFECÇÃO PELO <i>M. TUBERCULOSIS</i>	38
FIGURA 6: INCIDÊNCIA ESTIMADA DA TUBERCULOSE NO MUNDO.....	40
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA pVALAC (VACCINATION USING LACTIC ACID BACTERIA, GUIMARÃES ET AL., 2009) CONTENDO A ORF ESAT-6 DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	59
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR pBAD202/D-TOPO®.....	67
FIGURA 9: CRONOGRAMA DE IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS COM AS LINHAGENS VACINAIS DE <i>L. LACTIS</i>	78
FIGURA 10: CONFIRMAÇÃO DA ORF ESAT-6 EM <i>L. LACTIS</i> MG1363.....	86
FIGURA 11: CURVA DE CRESCIMENTO DE DIFERENTES LINHAGENS DE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> PELA MEDIDA DE DENSIDADE ÓPTICA (DO ₆₀₀).....	87
FIGURA 12: CURVA DE CRESCIMENTO DE DIFERENTES LINHAGENS DE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> PELA CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC).....	88
FIGURA 13: AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA ORF ESAT-6 NO VETOR pBAD202/D-TOPO®.....	91
FIGURA 14: CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM E ORIENTAÇÃO DA ORF ESAT-6 NO VETOR pBAD202/D-TOPO®.....	92
FIGURA 15: SDS-PAGE DA INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ESAT-6 A PARTIR DA LINHAGEM <i>E. COLI</i> pBAD:ESAT-6.....	93
FIGURA 16: CINÉTICA DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ESAT-6.....	94
FIGURA 17: AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RESAT-6.....	95

FIGURA 18: TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE UREIA, DA PROTEÍNA RESAT-6.....	96
FIGURA 19: PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RESAT-6 EM FPLC.....	97
FIGURA 20: CONFIRMAÇÃO DA PUREZA E IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA RESAT-6.....	98
FIGURA 21: PRODUÇÃO DE IL-10, IL-6, IL-12 E TNF-A POR MACRÓFAGOS EM COCULTURA COM AS LINHAGENS DE <i>L. LACTIS</i>	100
FIGURA 22: INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE IFN- γ PELOS ESLENÓCITOS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS LINHAGENS DE <i>L. LACTIS</i>	103
FIGURA 23: INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE TNF-A E IL-12 PELOS ESLENÓCITOS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS LINHAGENS DE <i>L. LACTIS</i>	104
FIGURA 24: INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-10 E IL-4 PELOS ESLENÓCITOS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS LINHAGENS DE <i>L. LACTIS</i>	106
FIGURA 25: CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE SÍGA ESPECÍFICA NAS FEZES DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS LINHAGENS DE <i>L. LACTIS</i>	108
FIGURA 26: PRODUÇÃO DE SÍGA ESPECÍFICA NO MACERADO DO CÓLON DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS LINHAGENS DE <i>L. LACTIS</i>	109
FIGURA 27: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE IGA ESPECÍFICA NO SORO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS LINHAGENS DE <i>L. LACTIS</i>	111
FIGURA 28: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE IGG ESPECÍFICA NO SORO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS LINHAGENS DE <i>L. LACTIS</i>	112
FIGURA 29: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE IGG1 ESPECÍFICA NO SORO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS LINHAGENS DE <i>L. LACTIS</i>	112
FIGURA 30: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE IGG2A ESPECÍFICA NO SORO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM AS LINHAGENS DE <i>L. LACTIS</i>	113
FIGURA 31: ANÁLISE DE CÉLULAS T CD4+ E T CD8+ PRODUTORAS DE IFN- γ POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: LINHAGENS BACTERIANAS.....	57
TABELA 2: PLASMÍDEOS UTILIZADOS.....	58
TABELA 3: PRIMERS PARA AMPLIFICAÇÃO DE INSERTOS NO VETOR PVALAC.....	63
TABELA 4: PRIMERS UTILIZADOS NA PCR DA ORF ESAT-6.....	66
TABELA 5: PRIMERS UTILIZADOS PARA A CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DA ORF ESAT-6 NO VETOR PBAD:ESAT-6.....	70
TABELA 6: UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA DAS DIFERENTES LINHAGENS UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS DE IMUNIZAÇÃO.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: AMINOÁCIDOS

ADCC: ANTIBODY-DEPENDENT CELL-MEDIATED CITOTOXICITY

APCs: ANTIGEN-PRESENTING CELLS

BCG: BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN

BGH: BOVINE GROWTH HORMONE

BL: BACTÉRIAS LÁCTICAS

BLAST: BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL

BLG: B-LACTOGLOBULINA BOVINA

CCR: RECEPTOR DE QUIMIOCINAS

CÉLULAS M: CÉLULAS MICROPREGAS

CÉLULAS NK: CÉLULAS NATURAL KILLER

CEUA: COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CFP-10: 10-kDa CULTURE FILTRATE PROTEIN

CHO: CHINESE HAMSTER OVARY

CM: CHLORAMPHENICOL

CMV: CITOMEGALOVIRUS

CTL: CITOLYTIC T LYMPHOCYTE

DCs: DENDRITIC CELLS

DMEM: DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM

DO: DENSIDADE ÓPTICA

ECANS: EPITOPES CASTED IN A NATURAL STRUCTURE

ELISA: ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

ELISPOT: ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT SPOT

ERY: ERYTHROMYCINUM

ESAT-6: 6-kDA EARLY SECRETED ANTIGENIC TARGET

ESX-1: SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO VII

EUA: ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA

FACS: FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING

FAE: FOLLICLE-ASSOCIATED EPITHELIUM

FNBPA: FIBRONECTIN BINDING PROTEIN A

FPLC: FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY

GALT: GUT-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE

GFP: GREEN FLUORESCENT PROTEIN

GRAS: GENERALLY RECOGNIZED AS SAFE

HIV: HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS

HIV-1: HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS 1

ICB: INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

IGA: IMUNOGLOBULINA A

INTA: INTERNALINA A

IL: INTERLEUCINA

IFN- γ : INTERFERON-GAMA

IUATLD: INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE

KM: KANAMYCIN

LB: LURIA-BERTANI

LCCM: L-CELL CONDITIONED MEDIA

LM: LINFONODO MESENTÉRICO

LPS: LIPOPOLISSACARÍDEO

LT- A: LINFOTOXINA-ALFA

M17-SAC-GLI: M17 SACAROSE GLICOSE

MDR-TB: MULTI-DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS

MOI: MULTIPLICITY OF INFECTION

MOTIVOS CpG: MOTIVOS CITOSINA-FOSFATO-GUANINA

NCBI: NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION

NICE: NISIN CONTROLLED EXPRESSION SYSTEM

ORF: OPEN READ FRAME

PAMPS: PATHOGEN-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS

PBS: PHOSPHATE BUFFERED SALINE

PEG3000: POLYETHYLENE GLYCOL 3000

PCR: POLYMERASE CHAIN REACTION

PCMV: CITOMEGALOVIRUS PROMOTER

POLI-A: SEQÜÊNCIA SINAL DE POLIADENILAÇÃO

PP: PLACAS DE PEYER

PPD: PURIFIED PROTEIN DERIVATIVE

PVALAC: VACCINATION USING LACTIC ACID BACTERIA

PVDF: POLYVINYLIDENE DIFLUORIDE

RD: REGIÕES DE DIFERENÇA

RD1: REGIÃO DE DIFERENÇA 1

RNI: REACTIVE NITROGEN INTERMEDIATES

ROI: REACTIVE OXIGEN INTERMEDIATES

RPM: ROTAÇÕES POR MINUTO

SDS-PAGE: SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

SED: SUBEPITHELIAL DOMME

SEM: STANDART ERROR OF THE MEAN

IGA: IMUNOGLOBULINA A

SIGA: IMUNOGLOBULINA A SECRETÓRIA

TB: TUBERCULOSE

TCPDO: TRATAMENTO DE CURTO PRAZO DIRETAMENTE OBSERVADO

TE-LYS: TE-LISOZIMA

TGF-B: TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA

TH: T HELPER

THP-1: HUMAN MONOCYTIC LEUKEMIA CELL LINE

TNF-A: TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA

TREG: CÉLULAS T REGULATÓRIAS

TLR: TOLL-LIKE RECEPTOR

TST: TUBERCULIN SKIN TEST

TTFC: TETANUS TOXIC FRAGMENT C

UFC: UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA

Usp45: UNKNOWN SECRETED PROTEIN OF 45 KDA

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION

XDR-TB: EXTENSIVELY DRUG-RESISTENT TUBERCULOSIS

XIES: XYLOSE-INDUCIBLE EXPRESSION SYSTEM

5'-UTR: 5'- UNTRANSLATED REGION

RESUMO

O uso de bactérias não patogênicas, como as bactérias lácticas (BL), constitui uma alternativa atrativa e segura para a entrega de vacinas de DNA pela via oral. *Lactococcus lactis*, uma BL modelo, é considerada GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e, portanto, tem sido amplamente utilizada para a produção e entrega de antígenos e citocinas ao nível de mucosas. Desta forma, *L. lactis* surge como uma alternativa atrativa para a veiculação de vacinas de DNA. Assim, acredita-se que o uso da linhagem invasiva de *L. lactis*, expressando o gene FnBPA (*Fibronectin binding protein A*) de *Staphylococcus aureus*, contendo o vector pValac, para a expressão eucariótica do antígeno ESAT-6 (*6-kDa early secreted antigenic target*) de *Mycobacterium tuberculosis*, pode representar uma nova estratégia para o controle da tuberculose; uma doença infecciosa que afeta, na sua forma latente, 1/3 da população mundial. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a utilização de *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) para a imunização de camundongos e avaliação da resposta imunológica gerada por esta nova estratégia vacinal. Para isto, a linhagem *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) foi utilizada para a realização de experimentos de imunização oral em camundongos BALB/c, a fim de caracterizar o perfil da resposta imune gerada. Após a imunização, os níveis de citocinas e imunoglobulinas foram medidos por Ensaio Imunoenzimático (ELISA), onde foi verificado uma elevada produção de IFN- γ pelos esplenócitos murinos imunizados com a linhagem *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), demonstrando uma resposta imune do tipo Th1, necessária na imunização contra a infecção por *M. tuberculosis*. Além disto, foi possível detectar a presença de sIgA anti-ESAT-6 no extrato das fezes e cólon dos animais, evidenciando uma resposta imune de mucosas após imunização com a linhagem *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). Sendo assim, este trabalho constitui o primeiro passo rumo à validação desta nova vacina de DNA baseada em BL geneticamente modificadas.

ABSTRACT

The use of non-pathogenic bacteria, such as lactic acid bacteria (LAB), constitutes an attractive and safer alternative for plasmid DNA vaccine delivery by oral route. *Lactococcus lactis*, the model BL, is considered GRAS (Generally Recognized As Safe) and, therefore, has been extensively used for the production and delivery of antigens and cytokines at the mucosal level. Now, *L. lactis* arises as an attractive alternative for the delivery of plasmid DNA vaccines. Thus, it is believed that the use of the invasive *L. lactis* FnBPA (Fibronectin Binding Protein A) strain, containing the pValac vector, for eukaryotic expression of the ESAT-6 antigen (6-kDa Early Secreted Antigenic Target) of *Mycobacterium tuberculosis*, could represent a new strategy for controlling Tuberculosis; an infectious disease that affects, in its latent form, 1/3 of the world's population. Thus, this study aimed to use *L. lactis* FnBPA (pValac:ESAT-6) to immunize mice and evaluation of immune response generated by this vaccine strategy. Thus, the strain *L. lactis* FnBPA (pValac:ESAT-6) was used for conducting an oral experiment immunization in BALB/c mice in order to know the profile of the immune response generated. Thus, following immunization, the levels of cytokines and immunoglobulins were measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), where was high IFN- γ production by spleen mice immunized by the strain *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), statistically different from controls, denoting a Th1 type immune response, needed for immunization against *M. tuberculosis* infection. Moreover, it was possible to detect the presence of anti-ESAT-6 sIgA in the extract of colon and faeces of the animals, demonstrating a mucosal immune response after immunization with *L. lactis* FnBPA (pValac: ESAT-6). Thus, this work constitutes the first step towards validation of this new DNA vaccine based on genetically modified LAB.

I. APRESENTAÇÃO

I. APRESENTAÇÃO

I.1 Colaborações

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito de uma colaboração entre o Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) e o Laboratório de Imunobiologia (LIB), ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esta colaboração ocorreu devido ao interesse mútuo dos laboratórios, acima citados, em promover o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas, terapêuticas e profiláticas para as bactérias lácticas. Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Professor Doutor Anderson Miyoshi (LGCM – UFMG) e contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

I.2 Introdução Geral

Diversos agentes infecciosos invadem o hospedeiro através da superfície de mucosas, sendo a microbiota intestinal o estímulo primário para a ativação do sistema imune de mucosas (Deplancke e Gaskins, 2002; Macfarlane e Cummings, 2002). Sendo assim, o uso de bactérias como veículo para a entrega de plasmídeos vacinais pela rota oral constitui uma estratégia de vacinação promissora contra um largo espectro de doenças infecciosas (Schoen *et al.*, 2004). Bactérias patogênicas atenuadas tais como *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* têm sido utilizadas para a entrega de vetores (plasmídeos) de expressão eucariótica em células de mamíferos (Daudel *et al.*, 2007). Após essas bactérias serem internalizadas por células epiteliais e serem fagocitadas, o plasmídeo consegue escapar da vesícula fagolisossomal, podendo alcançar o núcleo da célula hospedeira, resultando na expressão da ORF (*Open Read Frame*) de interesse e posterior apresentação antigênica (Grillot-Courvalin *et al.*, 1999). Contudo, esses organismos apresentam riscos de reversão ao seu fenótipo selvagem, ou seja, podem voltar a ser patogênicos, não sendo, assim, totalmente seguros para uso humano, especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (Dunham, 2002). Tal situação poderia ser contornada pela utilização de bactérias não patogênicas.

Neste contexto, o uso de Bactérias Lácticas (BL) como veículo para a entrega de plasmídeos vacinais representaria uma alternativa atrativa em relação a patógenos atenuados (Wells e Mercenier, 2008). As BL constituem um grupo diverso de microrganismos Gram-positivos capazes de converter açúcares em ácido lático. Dentre os representantes deste grupo de bactérias, *Lactococcus lactis* é a espécie mais bem caracterizada e figura como um microrganismo modelo no estudo das mesmas; não só pela sua importância econômica, como na indústria de laticínios, mas também devido ao fato de ser um microrganismo de fácil manipulação, ser geralmente reconhecidas como seguras (*Generally Recognized As Safe*, GRAS), ter o seu genoma completamente sequenciado e possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (Azevedo e Miyoshi, 2004; Bahey-El-Din e Gahan, 2010a). Além disso, moléculas heterólogas, de interesse biotecnológico, vêm sendo intensamente produzidas em *L. lactis* (Wells e Mercenier, 2008). Dessa maneira, o uso de *L. lactis* como um veículo para a entrega de plasmídeos vacinais é bastante promissor.

Para isto, uma linhagem recombinante de *L. lactis*, expressando a proteína A de ligação à Fibronectina (FnBPA) de *Staphylococcus aureus* (Que *et al.*, 2001), foi construída e posteriormente testada com o objetivo de melhorar e facilitar a entrega do DNA plasmideano à células de mamíferos (Innocentin *et al.*, 2009). FnBPA medeia a adesão da bactéria ao tecido hospedeiro e sua entrada em células não fagocíticas (Sinha *et al.*, 2000). Foi demonstrado que *L. lactis*, expressando FnBPA, foi capaz de entregar um plasmídeo de expressão eucariótica funcional à linhagem celular Caco-2 (Innocentin *et al.*, 2009). Além disso, um novo plasmídeo, chamado pValac (*Vaccination using Lactic acid bacteria*), de 3.742 pb foi construído. O pValac foi formado pela fusão do (i) promotor do citomegalovírus (pCMV) que permite a expressão do antígeno em células eucarióticas, (ii) sítio de clonagem múltipla, (iii) sequência sinal de poliadenilação (poli-A) do Hormônio Bovino de Crescimento (BGH, *Bovine growth hormone*) para estabilizar o transcrito de RNA mensageiro, (iii) origens de replicação que permitem a propagação do plasmídeo tanto em *Escherichia coli* quanto em *L. lactis*, e (iv) um gene de resistência ao cloranfenicol para a seleção das linhagens recombinantes (Guimarães *et al.*, 2009).

Desta forma, a utilização de linhagens invasivas de *L. lactis* para a entrega do vetor (plasmídeo vacinal) de expressão eucariótica, pValac, expressando um antígeno de

interesse, poderia representar uma nova estratégia para o controle de doenças infecciosas, como, por exemplo, a tuberculose.

A Tuberculose (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis*, é uma doença infecto-contagiosa que atinge um terço da população mundial na sua forma latente, fato que torna esta doença um dos principais problemas sociais, econômicos e de saúde pública do mundo (Lugo e Bewley, 2008). O tratamento da TB consiste na administração de múltiplos antibióticos durante um período de tempo prolongado que, geralmente, não é seguido pelos pacientes; o que contribui para o surgimento de linhagens multidroga resistentes, tornando esta medida pouco eficaz. Além da quimioterapia convencional, a doença pode ser controlada utilizando-se a BCG (Bacillus Calmette-Guérin), única vacina disponível para uso clínico. Verificou-se que esta vacina é capaz de proteger crianças contra as formas mais severas da TB (Trunz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). Entretanto, ainda que a BCG venha sendo amplamente utilizada no Brasil e em outros países, a eficácia da mesma permanece controversa. A eficácia da vacina contra a TB pulmonar em pacientes adolescentes e adultos varia de 0 a 80%, dependendo da população estudada (Brewer, 2000; Britton e Palendira, 2003; Liu *et al.*, 2009). Dessa maneira, estratégias para o desenvolvimento de novas vacinas mais eficazes e economicamente viáveis têm sido alvo de intensa investigação.

As proteínas secretadas por *M. tuberculosis*, nos primeiros estágios de infecção, são consideradas alvos para a obtenção de antígenos candidatos a vacinas, pois, presumivelmente, elas são as primeiras a estabelecerem um contato com o sistema imunológico do hospedeiro. A família ESAT-6 (*6-kDa Early Secreted Antigenic Target*) agrupa pequenas proteínas secretadas por *M. tuberculosis*, sobretudo na fase inicial do crescimento (Renshaw *et al.*, 2002). ESAT-6 é um fator de virulência codificado na região genômica chamada RD-1, região esta, ausente em *Mycobacterium bovis* atenuado, ou seja, na BCG (Gey van Pittius *et al.*, 2001). Contudo, este região está presente em todas as linhagens virulentas de *M. tuberculosis* (Harboe *et al.*, 1996). Mais ainda, trabalhos prévios (Andersen *et al.*, 1995; Sorensen *et al.*, 1995) demonstraram que ESAT-6, seja como uma vacina de subunidade ou como uma vacina de DNA (Kamath *et al.*, 1999; Brandt *et al.*, 2000), é capaz de induzir a produção de IFN- γ por células T em camundongos infectados, resultando em proteção.

Sendo assim, tendo em mãos a construção do plasmídeo vacinal pValac:ESAT-6 e a linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (Pereira, V. B – dissertação de

Mestrado), este trabalho teve como objetivo a utilização desta linhagem para a entrega da vacina de DNA pValac:ESAT-6, *in vivo*, pela via de mucosas, utilizando-se de camundongos BALB/c como modelo murino.

Enfim, o trabalho aqui apresentado visou, principalmente, validar o sistema de entrega vacinal *L. lactis* FnBPA e é parte integrante de uma grande linha de pesquisa cuja meta é implementar e testar a eficácia e a efetividade de novas vacinas gênicas baseadas em BL geneticamente modificadas.

I.3 Estrutura da tese

Este manuscrito apresenta, em sua primeira seção, uma revisão de literatura dividida em cinco pontos principais: (i) as vacinas de DNA, seu mecanismo de ação e as principais vias de entrega, destacando-se a via de mucosas e seus mecanismos de ativação da resposta imune; (ii) as BL como veículos para entrega de plasmídeos vacinais, especialmente no que concerne ao uso de linhagens invasivas de *L. lactis*; (iii) as características do bacilo *M. tuberculosis* e da Tuberculose como sendo uma doença reemergente no mundo e (iv) a proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis* como um antígeno vacinal e sua utilização como vacina de DNA. Em seguida, encontram-se a justificativa, os objetivos deste trabalho e a metodologia utilizada para o desenvolvimento do mesmo. Os resultados serão apresentados e discutidos em quatro partes: (i) obtenção das linhagens de *L. lactis* para os experimentos de imunização; (ii) obtenção da proteína recombinante ESAT-6; (iii) avaliação da imunogenicidade das linhagens de *L. lactis*, em especial *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), em cocultura de macrófagos e (iv) experimentos de imunização com as linhagens de *L. lactis*, em especial *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), em camundongos BALB/c. Por fim, as conclusões e as perspectivas do presente trabalho serão demonstradas, seguindo-se as Referências Bibliográficas e os Anexos, onde se encontram: (i) um capítulo de livro, (ii) uma revisão sobre vacinas de DNA, (iii) artigo científico com os resultados obtidos e aqui apresentados e (iv) Soluções e meios.

II. INTRODUÇÃO

II. INTRODUÇÃO

II.1 Vacinas de DNA

As “vacinas de DNA” são as mais recentes formas de vacina e representam uma interessante alternativa para a apresentação de moléculas antigênicas ao sistema imune. Elas consistem na administração de um vetor (plasmídeo vacinal) contendo um cassete de expressão eucariótico, responsável por codificar o antígeno de interesse no hospedeiro, possibilitando a geração de antígenos, *in vivo* (Gurunathan *et al.*, 2000a).

Uma das primeiras evidências do uso imunológico de uma molécula de DNA foi em 1992 por Tang *et al.* (Tang, DeVit e Johnston, 1992). Seus estudos mostram que a injeção da sequência codificadora do hormônio do crescimento humano, na pele de camundongos, foi capaz de aumentar a produção de anticorpos específicos contra este hormônio, sugerindo que o DNA poderia ser utilizado para induzir resposta imune contra infecções patogênicas. Logo após, inicia-se uma nova era de vacinas com a demonstração de que as vacinas de DNA eram capazes de gerar uma resposta imune específica contra o vírus influenza, o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1, *Human immunodeficiency virus*), o vírus herpes bovino I e o vírus da raiva (Ulmer *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Cox *et al.*, 1993; Xiang *et al.*, 1994).

Hoje, as vacinas de DNA constituem uma nova geração de produtos biotecnológicos, utilizados tanto como vacinas quanto como terapia gênica, que estão apenas começando a entrar no mercado. Quatro vacinas de DNA foram licenciadas e estão sendo comercializadas para uso veterinário. Duas destas vacinas são para doenças infecciosas [vacina contra o vírus do Nilo Ocidental em cavalos (Center for Disease Control and Prevention and Fort Dodge Laboratories - USA) e vacinas contra o vírus da necrose hematopoética infecciosa em salmão (Novartis - Canadá)]. As outras duas vacinas são contra o câncer maligno melanoma em cães (Merial - USA) e para a liberação hormonal do fator de crescimento em suínos (VGX Animal Health - Austrália) (Kutzler e Weiner, 2008). Além disto, diversos ensaios clínicos, profiláticos e terapêuticos vêm sendo realizados (www.clinicaltrials.gov) com vacinas de DNA contra vários tipos de câncer como câncer de próstata, cervical, cerebral, colorretal, de ovário, rim, fígado, melanoma, leucemia, linfoma, além de ensaios clínicos com vacinas de DNA contra a malária, influenza, hepatite B e C, tuberculose, tétano, adenovírus e HIV-1 (Tacket *et al.*, 1999; Mincheff *et al.*, 2000; Le *et al.*, 2000; Liu e Ulmer, 2005; Ulmer, Wahren e Liu, 2006). Estes testes demonstraram que as vacinas de DNA são bem

toleradas e seguras, uma vez que não foram relatados eventos adversos em todos os estudos já concluídos.

Enfim, as vacinas de DNA apresentam inúmeras vantagens sobre as vacinas tradicionais em termos de segurança, facilidade de fabricação e estabilidade. As vacinas de DNA podem induzir tanto a resposta imune humoral quanto a resposta imune celular (Cattamanchi *et al.*, 2008), porém, diferentemente das vacinas vivas e de subunidade, são altamente seguras, estáveis e não requerem refrigeração, sendo mais práticas para o uso em países em desenvolvimento. Além disto, devido a sua estrutura simples, modificações na construção do plasmídeo vacinal podem ser feitas em um curto período de tempo, sendo rapidamente replicados em bactérias (Kutzler e Weiner, 2008).

II.1.1 Estrutura do plasmídeo para uso como vacina de DNA

Basicamente, a vacina de DNA é composta por um plasmídeo formado por duas regiões: uma região de propagação procariótica e outra região de expressão eucariótica, responsável por codificar um, ou mais, antígeno vacinal.

A região de propagação procariótica contém uma origem de replicação bacteriana, geralmente ColE1 de *Escherichia coli* (Williams *et al.*, 2009), a qual permite a propagação dos plasmídeos em bactérias. Além disto, marcadores de seleção (geralmente genes cujos produtos conferem resistência a antibióticos) são responsáveis pela estabilidade e manutenção do plasmídeo na célula bacteriana; como o gene que confere resistência à canamicina, o mais utilizado (Ingolotti *et al.*, 2010).

Já a região de expressão eucariótica contém a unidade de transcrição, geralmente composta por um promotor viral constitutivo que confere um alto nível de expressão à ORF de interesse, em células eucarióticas. O promotor do Citomegalovírus (pCMV) é o mais usado atualmente por promover um bom nível expressão constitutiva do antígeno de interesse (Kutzler e Weiner, 2008) (Figura 1).

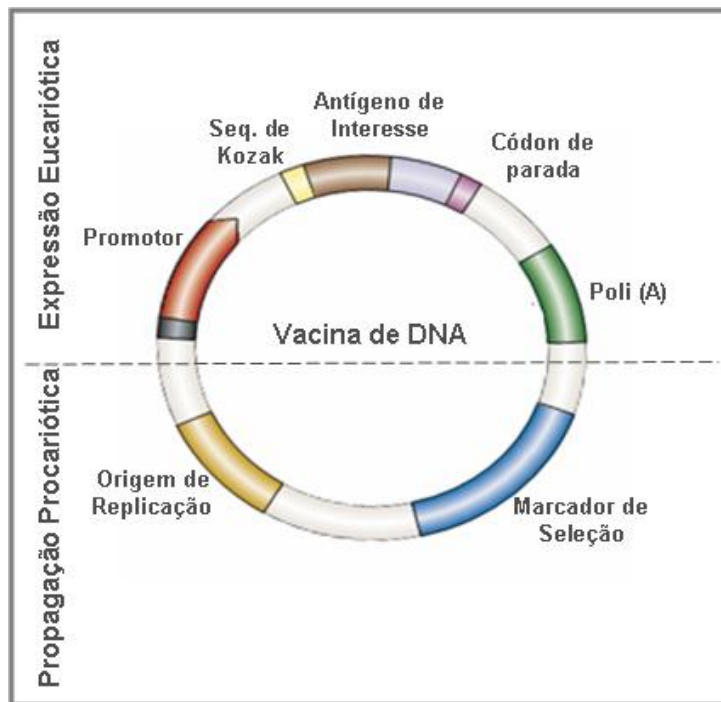


Figura 1: Representação esquemática de um plasmídeo para uso como vacina de DNA. Na parte superior da figura encontra-se a região de expressão eucariótica. Esta região é composta pelo promotor, a seqüência de Kozak, o códon de parada e a seqüência sinal de poliadenilação (Poli-A). Na parte inferior da figura encontra-se a região de propagação procariótica, a qual é responsável pela propagação e manutenção do plasmídeo vacinal na célula bacteriana. Esta região contém uma origem de replicação procariótica e um marcador de seleção (Adaptado de Kutzler e Weiner, 2008).

A presença de uma seqüência consenso específica, denominada seqüência de Kozak (ACCATGG), também é necessária no plasmídeo para uso como vacina de DNA, sendo esta presente no mRNA eucarioto para iniciação da síntese protéica. Além disto, para garantir o término correto da seqüência polipeptídica, também é importante a inserção de um ou mais *stop codons* e a presença da seqüência sinal de poliadenilação (AAUAAA; Poli-A). O sinal de poliadenilação é necessário para a correta finalização da transcrição, adição da cauda poli-A e exportação do mRNA do núcleo para o citoplasma; o que, por sua vez, confere estabilidade ao mRNA. A maioria dos vetores contém o sinal de poliadenilação de SV40 ou do BGH, sendo, esta última, a seqüência mais comumente utilizada (Kutzler e Weiner, 2008; Xu *et al.*, 2002).

II.1.1.1 Otimização do plasmídeo e do inserto para uso como vacina de DNA

Diversos estudos estão sendo feitos visando a otimização da estrutura do plasmídeo e do inserto a ser utilizado como vacina de DNA. Sequências imunostimulatórias, chamadas motivos citosina-fosfato-guanina (motivos CpG), desempenham um papel fundamental na imunidade inata e adaptativa pela estimulação de linfócitos B, células dendríticas, macrófagos e células *Natural Killer* (Células NK) (Li e Zhu, 2006; Kumagai *et al.*, 2008), apresentando propriedade adjuvante nos plasmídeos utilizados como vacinas de DNA (Angel *et al.*, 2008). Além disto, pesquisas vêm demonstrando que a co-injeção de plasmídeos imunomoduladores, codificando citocinas, constitui uma estratégia promissora para melhorar a eficácia das vacinas de DNA (Chong *et al.*, 2007).

A otimização dos códons (*codon usage*) também tem sido utilizada para maximizar a expressão da ORF de interesse na célula hospedeira; o que, por sua vez, envolve alteração específica da sequência codificadora de acordo com os níveis de tRNA, geralmente, disponíveis naquela célula, resultando em maiores taxas de tradução da proteína (Tokuoka *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Muthumani *et al.*, 2008). A adição de sequências líder ou região 5' não-traduzida (5'-UTR, 5' - *Untranslated Region*) antes da ORF de interesse podem aumentar a estabilidade do mRNA e também contribuir para uma maior eficiência de tradução (Xu *et al.*, 2001). Além disto, a ORF de interesse também pode ser modificada para produção de proteínas secretadas, ligadas à membrana, citoplasmáticas ou associada a uma organela, sendo que a alteração da localização celular pode influenciar na resposta imunológica (Becker *et al.*, 2008).

Outra estratégia bastante utilizada atualmente é a utilização de uma vacina mista, onde a primeira dose da vacina tem uma formulação e o reforço tem uma formulação diferente, denominado *prime-boost* (dose-reforço) (Wang *et al.*, 2004). A estratégia *prime-boost* têm sido aplicada a um grande número de vacinas de DNA, incluindo para o vírus da imunodeficiência humana (HIV, *Human immunodeficiency virus*) (Dale *et al.*, 2006; Kent *et al.*, 2007; Patterson e Robert-Guroff, 2008), vírus da gripe aviária (Pan *et al.*, 2009), tuberculose (Wang *et al.*, 2009) e malária (Moore e Hill, 2004), demonstrando, assim, que esta técnica pode produzir melhores resultados imunológicos que os normalmente alcançados pelas formulações convencionais de vacinas de DNA.

II.1.2 Barreiras para a entrega das vacinas de DNA

O sucesso na vacinação com DNA depende do plasmídeo atingir o núcleo para que a transcrição da ORF de interesse ocorra. Contudo, para que isso venha a ocorrer, é necessário que o plasmídeo supere uma série de barreiras que impedem a transferência de DNA exógeno para seu tecido alvo. Inicialmente, enquanto os plasmídeos estão no meio extracelular, estes podem ser degradados por nucleases do soro/tecido ou ainda serem detectados por linfócitos/macrófagos, sendo degradados em poucos minutos; o que ilustra a necessidade de atravessar rapidamente a membrana plasmática das células-alvo (Lechardeur *et al.*, 1999). No entanto, atravessar a membrana plasmática não é uma tarefa fácil devido à densa barreira da matriz extracelular e à repulsão elétrica da membrana lipídica ao DNA (Miller e Dean, 2009).

Neste contexto, com o objetivo de otimizar a entrega de vacinas de DNA diretamente dentro das células, diversos métodos de transfecção celular vêm sendo testados. Dentre os métodos de transfecção celular destacam-se a biobalística (bombardeio de partículas de ouro revestidas com os plasmídeos de DNA), a eletroporação (geração de poros na membrana celular pela aplicação de pulsos de alta voltagem, permitindo a entrada dos plasmídeos de DNA), a utilização de lipossomas (um sistema vesicular que protege e auxilia a entrada do DNA na célula) (Zaharoff *et al.*, 2002; Fuller *et al.*, 2006; Xu, Ding e Yang, 2008b), os vetores virais [capazes de invadir a célula e transferir o DNA para o núcleo, como o adenovírus (Benihoud *et al.*, 1999), Retrovírus (Hu e Pathak, 2000) e Vaccinia virus (Moorthy *et al.*, 2003)] e as bactérias [capazes de invadir ou serem fagocitadas, entregando o plasmídeo diretamente dentro da célula hospedeira (Guimarães *et al.*, 2009)].

Outro obstáculo à transferência gênica são as barreiras intracelulares. O envelope nuclear representa um grande obstáculo ao plasmídeo. Muitos métodos de transferência gênica requerem células em constante divisão, pois a desintegração do envelope nuclear resulta em maior acesso do plasmídeo vacinal ao núcleo (Fasbender *et al.*, 1997). Foi verificado que a importação nuclear de DNA é um processo que pode ser otimizado pelo uso de seqüências virais específicas. Em SV40, uma seqüência nucleotídica, conhecida como seqüência de endereçamento nuclear, de 72 pb, é capaz de conduzir a importação do plasmídeo ao compartimento nuclear (Dean *et al.*, 1999). Esta seqüência contém sítios de ligação para vários fatores de transcrição que apresentam sinais de localização nuclear. Assim, o complexo proteína-plasmídeo é transportado

através do poro nuclear pela maquinaria de importação da célula hospedeira (Dean, 1997; Wilson *et al.*, 1999); o que, conseqüentemente, aumenta as taxas de transcrição da ORF de interesse.

II.1.3 Vias de administração para as Vacinas de DNA

As vacinas de DNA podem ser administradas por vias invasivas como intradérmica, intraperitoneal, subcutânea e intramuscular (Doria-Rose e Haigwood, 2003; Cherif *et al.*, 2011), ou por vias não invasivas, como a via de mucosa (Guimarães *et al.*, 2009).

A via invasiva é a mais utilizada em estudos com vacinas de DNA, devido a facilidade e simplicidade de administração, sendo a injeção intramuscular comumente utilizada (Kutzler e Weiner, 2008). Muitas vezes, as vacinas administradas por esta via utilizam DNA nu; o que requer múltiplas doses de grandes quantidades de plasmídeo, haja vista que o plasmídeo administrado é pobremente distribuído, sendo rapidamente degradado pelo organismo, inviabilizando o processo (Le *et al.*, 2000; Babiuk *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008).

Assim, a utilização da via de mucosas para a entrega de vacinas de DNA representa uma estratégia vacinal promissora. Diversas vacinas de mucosas são utilizadas em humanos com sucesso, como as vacinas orais contra poliovírus (Modlin, 2004), *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* (Levine, 2000), rotavírus (Kapikian *et al.*, 1996) e influenza vírus (Belshe *et al.*, 1998), sendo, esta última, intranasal.

A principal razão da utilização da via de mucosas para vacinação é devido ao fato de que a maioria das infecções iniciam-se a partir de uma superfície mucosa e na maioria das vezes a resposta imune local é necessária para a indução da proteção. Sendo assim, o objetivo destas vacinas é primeiramente a indução de imunidade protetora local e depois sistêmica, para impedir que o agente infeccioso colonize o epitélio da mucosa (bactérias não-invasivas), penetre e se replique no mesmo (vírus e bactérias invasivas), ou ainda que toxinas microbianas atinjam suas células alvo (Holmgren *et al.*, 2005). Diante do exposto, faz-se necessário uma melhor compreensão da imunologia das mucosas, principalmente a associada ao trato gastrointestinal.

II.1.3.1 A imunidade associada à mucosa intestinal

As superfícies de mucosas, como as mucosas oral/gastrointestinal, urogenital e respiratória, são consideradas os principais sítios de interação entre o organismo e o ambiente. As mucosas estão envolvidas por uma grande e frágil barreira epitelial que as separam do ambiente externo, representando o maior portal de entrada para patógenos no organismo. Sendo assim, as mucosas são protegidas por um importante e especializado sistema imune inato e adaptativo, o sistema imune de mucosas (Holmgren *et al.*, 2005). Porém, no caso do sistema imune intestinal, o mesmo deve ser capaz de discriminar entre antígenos prejudiciais à saúde, como patógenos e toxinas, de antígenos inofensivos como proteínas presentes nos alimentos e bactérias comensais (Mowad, 2003). Para lidar com esta situação, o sistema imune intestinal apresenta um complexo mecanismo regulatório capaz de manter a homeostase local.

As principais vias de mucosas que vem sendo testadas para fins de imunização com vacinas de DNA são a vaginal (Kanazawa *et al.*, 2008), a intranasal (Dou *et al.*, 2012) e a oral (Guimarães *et al.*, 2009). Dentre estas, a via mais comumente utilizada é a oral, haja vista que o trato gastrointestinal está envolvido pela maior área superficial de todo o corpo, com mais de 200 m² de mucosa somando-se o intestino delgado e intestino grosso (Pillai, S. *et al.* 2012). Assim, o tecido linfóide associado ao trato intestinal constitui o maior compartimento imune do organismo, sendo estimado que, somente este, produza de 70 a 85% das células imunes do corpo humano (Furness, Kunze e Clerc, 1999; Schroeter e Klaenhammer, 2009) e que a mucosa intestinal humana contenha aproximadamente 50 x 10⁹ linfócitos (Pillai, S. *et al.* 2012).

O sistema imune gastrointestinal apresenta uma organização anatômica que consiste basicamente de: (i) uma barreira epitelial mais externa, denominada lâmina própria, que previne a invasão microbiana; (ii) um tecido conjuntivo subjacente à barreira epitelial contendo células de diversos tipos, distribuídas de forma difusa, que são importantes para as respostas imunes inatas e adaptativas contra microrganismos locais e (iii) linfonodos drenantes, onde as respostas imunes adaptativas aos microrganismos invasores são iniciadas e amplificadas (Pillai, S. *et al.* 2012) (Figura 2).

O tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (*Gut-associated lymphoid tissue*, GALT), apresenta duas estruturas não encapsuladas proeminentes: os tecidos organizados em sítios de indução da resposta imune, também conhecidos como Placas de Peyer (PP), e os agregados menores de folículos linfóides ou folículos isolados

presentes no apêndice e no cólon (Pillai, S. *et al.* 2012). Além disto, há o sítio efetor, composto por linfócitos, células dendríticas (*Dendritic cells*, DCs) e macrófagos, que está disperso por toda a camada epitelial e tecido conjuntivo frouxo (Hamada *et al.*, 2002; Pillai, *et al.* 2012) (Figura 2).

As PP são folículos linfóides macroscópicos que se encontram abaixo da mucosa intestinal do intestino delgado (íleo distal). As PP maduras são compostas por centros germinativos contendo linfócitos B, células T auxiliares foliculares, DCs foliculares e macrófagos e, entre os folículos, existem áreas ricas em células T. Estes folículos não encapsulados são separados do lúmen intestinal por uma única camada colunar de células epiteliais associadas (*Follicle-associated epithelium*, FAE) e, abaixo desta, encontra-se uma área difusa chamada de cúpula subepitelial (*Subepithelial dome*, SED). O FAE apresenta baixos níveis de enzimas digestivas e vilosidades menos pronunciadas, além de ser infiltrado por um grande número de células B, células T, macrófagos e células dendríticas. A característica mais notável do FAE é a presença de enterócitos ou células epiteliais especializadas chamadas de células micropregas ou células M (*Microfold cells*). Estas células não apresentam vilosidades e nem a espessa camada de muco em sua superfície e estão presentes na cúpula de estruturas especializadas sobrepostas aos tecidos linfóides. Drenando todos estes sítios estão os linfonodos mesentéricos (LM), capazes de serem uma ponte entre o sistema imune de mucosas e o sistêmico (Debard *et al.*, 2001; Mowat, 2003; Wells, 2011) (Figura 2).

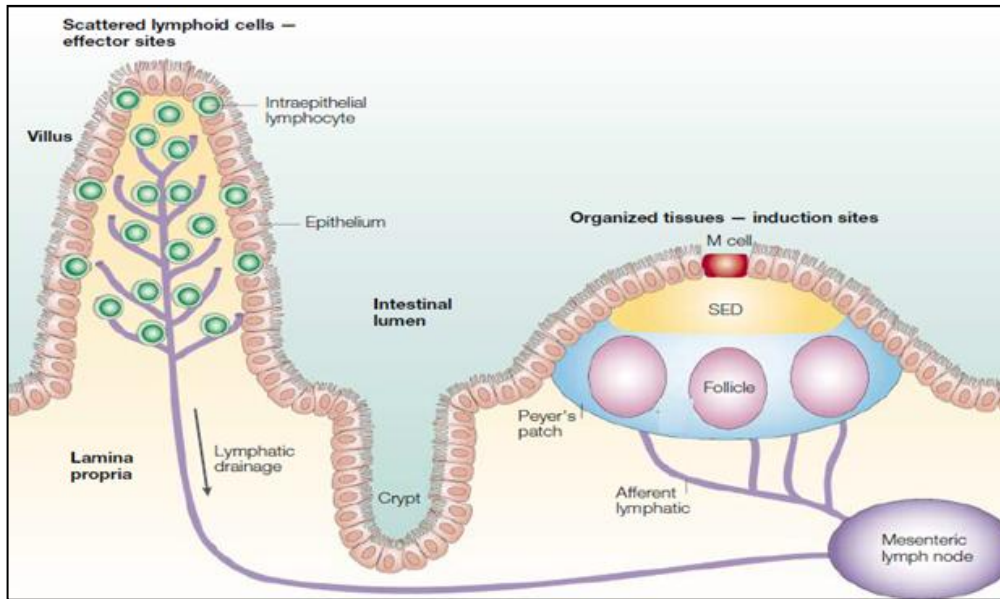


Figura 2: Representação esquemática dos elementos linfóides do sistema imune intestinal. Organização da Placa de Peyer e Linfonodo Mesentérico envolvido na indução de imunidade e tolerância, e do sitio efetor disperso pela Lâmina própria e epitélio. Ambos os sítios são drenados por vasos linfáticos que vão para o Linfonodo Mesentérico. (Adaptado de Mowat, 2003).

Resposta Inata associada às superfícies de mucosas

A superfície da mucosa intestinal está separada do ambiente externo por uma única camada de células epiteliais conectadas por fortes junções através das zonas de oclusão (*Tight junctions*) que protegem o organismo da presença de uma diversidade de microrganismos presentes no lúmen intestinal. Células epiteliais caliciformes especializadas, chamadas de células de Goblet, são capazes de produzir o muco intestinal, composto por glicoproteínas de mucina, um gel hidratado capaz de impedir o contato dos microrganismos com as células epiteliais (Neutra e Kraehenbuhl, 2005; Pillai, S. *et al.*, 2012).

Além disto, para ajudar na eliminação de bactérias que penetram a camada de muco, células epiteliais, denominadas de células de Paneth, secretam peptídeos antimicrobianos tais como α -defensinas, β -defensina, catelicidinas e lectinas do tipo C (Hooper e Macpherson, 2010). Todos estes tipos celulares contribuem para a função de barreira da mucosa, mas, mesmo assim, microrganismos e antígenos exógenos podem ser capazes de ultrapassar esta barreira.

As células epiteliais do intestino também são capazes de agirem como sensores que detectam a presença de “sinais de perigo” como, por exemplo, microrganismos patogênicos, através do reconhecimento de padrões por receptores do tipo Toll-like (TLR, *Toll-Like Receptor*). Estes receptores são expressos de forma regulada e se localizam em regiões específicas da célula como, por exemplo, na superfície basolateral ou até, exclusivamente, no citoplasma das mesmas. Estas células são capazes de responder ou aumentar a resistência das junções de oclusão entre as células ou, a partir de um limiar mais alto de ativação, sinalizar a invasão para macrófagos e DCs. Por sua vez, estas células desencadeiam uma resposta anti-inflamatória e antiviral não específica, que posteriormente auxilia na ativação de uma resposta imune adaptativa (Izapanah *et al.*, 2001; Neutra e Kraehenbuhl, 2005. Pillai, S. *et al.*, 2012).

Resposta Adaptativa associada à superfície de mucosas

Diversas estratégias imuno-efetoras são necessárias para a proteção das superfícies de mucosas (Neutra e Kozlowski, 2006). A produção de imunoglobulina A (IgA) é importantíssima na imunidade de mucosas. Esta Ig é produzida diretamente nos tecidos linfóides de mucosas por plasmócitos locais, e sua secreção é mediada pelo receptor poli-Ig que está presente nas células epiteliais intestinais, capaz de transportar ativamente a IgA por vesículas até o lúmen intestinal (Pillai, S. *et al.*, 2012). Em humanos, é produzido mais Imunoglobulina A (IgA) que todos os outros isotipos de imunoglobulinas combinados (van Egmond *et al.*, 2001). Diferentemente dos outros anticorpos, a IgA secretória (sIgA) é resistente à degradação por proteases, presentes na mucosa intestinal, como um resultado de sua dimerização e alto grau de glicosilação (Mestecky *et al.*, 2005) (Figura 3).

A sIgA apresenta inúmeros papéis na defesa do epitélio de mucosas. Ela é capaz de aprisionar antígenos e microrganismos no muco, impedindo o contato direto do patógeno com o epitélio, além de ser capaz de bloquear moléculas específicas de superfície celular de patógenos que medeiam a invasão das células epiteliais (Hutchings *et al.*, 2004). As IgA também se encontram abaixo do tecido epitelial de mucosas, sendo capazes de transportar, de volta ao lúmen, os patógenos que atravessaram a barreira epitelial ou mediar a destruição do patógeno por células citotóxicas dependentes de anticorpos (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) (Black, Cummins e Jackson, 1996; van Egmond *et al.*, 2001) (Figura 3).

A síntese de IgG local também pode ocorrer após a administração de antígenos e vacinas à superfície de mucosas (Mestecky *et al.*, 2005). A IgG presente nos tecidos de mucosas, assim como a IgM, pode neutralizar patógenos, prevenindo sua entrada nas mucosas e a sua circulação sistêmica (Neutra e Kozlowski, 2006).

Acredita-se que a abundância de linfócitos e células apresentadoras de antígenos (*Antigen-presenting cells*, APCs) seja tão grande na mucosa intestinal que esta apresente mais APCs que o baço e linfonodos juntos (Brandtzaeg *et al.*, 1999; van Egmond *et al.*, 2001). Assim, abaixo das “*tight junctions*” que unem o epitélio intestinal e acima da membrana basal do epitélio, estão presentes linfócitos T especializados, chamados de linfócitos T intraepiteliais. Em humanos, estes linfócitos expressam, predominantemente, a glicoproteína CD8, que se liga a MHC de classe I para a atividade de citotoxicidade (van Wijk e Cheroutre, 2009). Em resposta à injúria intestinal ou presença de bactérias nocivas, estes linfócitos intraepiteliais produzem citocinas próinflamatórias e quimiocinas, recrutando neutrófilos, eosinófilos e outras células T, além de promover a produção de fatores de crescimento para a proliferação e restauração do epitélio intestinal (Yang *et al.*, 2004).

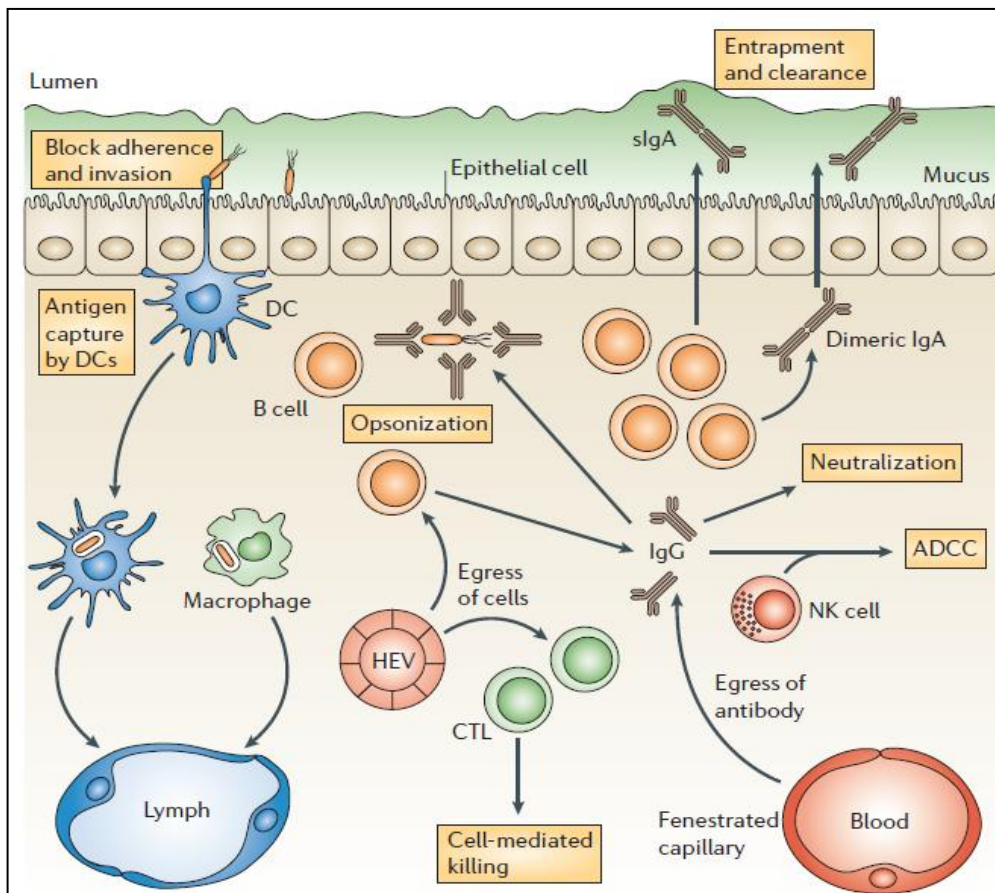


Figura 3: Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na proteção da superfície de mucosas. Células B e T antígeno específicas presentes na circulação penetram nas mucosas. Células B se diferenciam em plasmócitos para a secreção de IgA dimérica que é exportada juntamente com o muco para interceptação de antígenos e microrganismos, prevenindo a invasão do epitélio de mucosas. IgG neutralizantes, derivadas de plasmócitos locais ou de capilares por difusão, também estão presentes. Células infectadas são mortas por linfócitos citotóxicos ou por células mediadoras de citotoxicidade dependentes de anticorpos; uma colaboração entre células *Natural Killer* (NK) e anticorpos. Patógenos também podem ser capturados por células dendríticas (DC) e macrófagos e transportados até o linfonodo (Adaptado de Neutra e Kozlowski, 2006).

Abaixo da única camada epitelial, encontra-se a região da lâmina própria da mucosa, onde se encontram linfócitos T, principalmente do tipo CD4 e capazes de se ligarem à MHC de classe II. Estes linfócitos apresentam uma diversa coleção de subtipos, chamados de T auxiliares (T helper, Th), capazes de produzir citocinas e quimiocinas específicas para a ativação de linfócitos T CD8+ e diferenciação de linfócitos B (Smith e Garrett, 2011).

Os linfócitos se diferenciam no tipo Th1 pela presença de interleucina (IL) 12 e interferon-gama (IFN- γ) e produzem, principalmente, IFN- γ . Estas células Th1

participam da defesa contra microrganismos intracelulares e vírus, estimulando macrófagos e linfócitos, como na diferenciação de linfócitos T citotóxicos (CTL, *Cytolytic T Lymphocyte*) (Andrew *et al.*, 2012)

Linfócitos Th2 são diferenciados pela presença de IL-4, produzindo IL-4, IL-5 e IL-13, atuando na defesa contra helmintos e alérgenos. Já os linfócitos Th17 se diferenciam na presença do fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β), IL-1 e IL-6 e são capazes de produzir principalmente IL-17 e IL-22, protegendo contra bactérias e parasitas extracelulares; sendo este último subtipo, o Th17, o dominante no trato gastrointestinal (Smith e Garrett, 2011). Além disso, existem outras populações de células T reguladoras (Treg) que produzem as citocinas IL-10 e TGF- β (*Transforming growth factor beta*), capazes de regular tanto a resposta Th1 quanto Th2 (Biedermann, Röcken e Carballido, 2013). Assim, a interação destas células T CD4+ presentes na lâmina própria com a microbiota intestinal e com células epiteliais e APCs, como as células dendríticas, é crucial para a modelagem de uma resposta adaptativa intestinal (Smith e Garrett, 2011).

Indução da resposta imune intestinal

Nas PPs, as células M representam o principal caminho pelo qual os complexos antigênicos podem atingir o sistema imune. Estas células promovem a endocitose de vesículas contendo várias substâncias do lúmen intestinal, como bactérias inteiras, vírus e produtos microbianos solúveis, até as APCs presentes entre e abaixo do epitélio. As DCs são as principais APCs envolvidas neste processo que, ao entrar em contato com os antígenos, se movem até a região de células T e folículos de células B, onde interagem com os linfócitos imaturos. Nas PPs, células B sofrem a mudança de classe de IgM para IgA sobre a influência de muitos fatores locais, como a presença de TGF- β , IL-10 e sinais celulares de DCs e células T (McIntyre e Strober, 1999).

Além disto, antígenos e patógenos podem ser capturados da superfície de mucosas diretamente por DCs epiteliais que obtêm amostras do compartimento luminal (Niess *et al.*, 2005). Estas DCs são chamadas efetoras, pois interagem com células T e B virgens no GALT ou migram, através dos vasos linfáticos aferentes, para apresentação de antígenos nos LMs, promovendo uma resposta de células T efetoras produtoras de IFN- γ e IL-17 e também de memória (MacPherson e Liu, 1999; Fagarasan e Honjo,

2003; Pillai, S. *et al.*, 2012). Já as DCs reguladoras não fazem amostragem diretamente do conteúdo luminal, mas são importantes na diferenciação de células Treg pela secreção de TGF- β e ácido retinóico, tendo estas células um importante papel na tolerância a microrganismos comensais e dieta, principalmente, através da produção de IL-10 (Mayer e Shao, 2004; Pillai, S. *et al.*, 2012).

Os linfócitos ativados pelas DCs nas PPs e nos LMs, alí residem até sua diferenciação, voltando para a mucosa através vasos linfáticos eferentes. A saída destes linfócitos das PPs ocorre pela ligação da sua integrina $\alpha_4\beta_7$ ao seu ligante MadCAM-1, presente em altos níveis nos vasos da mucosa (Berlin *et al.*, 1993; Butcher *et al.*, 1999). Durante a ativação de linfócitos T e B primados em tecidos linfoides de mucosas, ocorre a ativação de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas (CCR), tecidos específicos, que guiam os linfócitos de volta às mucosas através do reconhecimento de moléculas presentes somente no endotélio vascular de mucosas (Kunkel e Butcher, 2003; Mora *et al.*, 2003).

Assim, os linfócitos T derivados do intestino são induzidos a expressar CCR9 que é atraída à mucosa devido à quimiocina CCL25 expressa, seletivamente, por células epiteliais do intestino delgado (Bowman *et al.*, 2002; Campbell e Butcher, 2002). As células T primadas nas mucosas são distintas de células T primadas em órgãos linfoides periféricos (Campbell e Butcher, 2002). Esta é a explicação molecular do porquê da imunização de mucosas ser importante para a proteção contra patógenos que infectam o hospedeiro por esta via (Mowat, 2003).

Da mesma forma, linfócitos B ativados nos tecidos linfoides associados às mucosas também expressam CCR9, além de CCR10, este último, receptor da quimiocina CCL28 que também é secretada por células epiteliais do intestino delgado e grosso (Kunkel e Butcher, 2003). Assim, células B CCR10 são atraídas por estes tecidos, explicando por que a imunização de mucosas em um determinado sítio pode resultar na secreção de IgA em outros tecidos de mucosas como, por exemplo, o pulmonar, havendo, portanto, um sistema imune de mucosas comum (Mestecky, 1987; Pillai, S. *et al.*, 2012).

Assim, os linfócitos efetores de volta à mucosa podem efetivar seu papel, como as células B amadurecidas em plasmócitos produzindo a IgA, as células T CD4+ atuando, principalmente, na regulação imune e as células T CD8+ migrando preferencialmente para o epitélio, onde podem ter uma potente ação citotóxica

(Lefrançois, Olson e Masopust, 1999). Além disto, estas células podem atuar como células efectoras de memória, sendo que, resultados de pesquisas, tem mostrado que células de memória T CD8+ e CD4+, antígeno específicas, se acumulam, preferencialmente, em tecidos não linfoides, em particular, na mucosa intestinal (Sallusto *et al.*, 1999).

Em última análise, a consequência imunológica da administração oral de um antígeno depende de onde e como o antígeno é capturado e apresentado às células T. O antígeno é diluído nas secreções, capturado pelo muco, atacado por proteases e nucleases, além de ser excluído pela barreira epitelial. Assim, altas doses do antígeno são necessárias e ainda existe o problema da indução de tolerância oral, ao invés da imunização (Neutra e Kozlowski, 2006). Neste contexto, a formulação vacinal e a estratégia de entrega são fatores importantes para superação destes desafios e para a indução de uma resposta imune efetiva (Ryan, Daly, e Mills, 2001).

Em geral, vacinas de mucosas tem se mostrado mais efetivas quando há a mimetização de patógenos intestinais em certas características, como a aderência à superfície da mucosa ou até, especificamente, às células M, sua adaptação à sobrevivência no ambiente luminal e a estimulação do sistema imune inato e adaptativo (Neutra e Kozlowski, 2006). Nesse contexto, as bactérias representam uma alternativa promissora para a entrega de plasmídeos vacinais diretamente à superfície de mucosas.

II.1.3.2 Utilização de bactérias para a entrega de vacinas de DNA

A transferência de genes de bactérias para as células de mamíferos foi observada, *in vitro*, por Schaffner (1980), quando as cópias, em tandem, do genoma do vírus SV40, carregadas por *E. coli*, foram transferidas, em cocultura, para células de mamíferos. Quinze anos depois, Sizemore *et al.* (1995) desenvolveram um sistema similar utilizando *Shigella flexneri* atenuada para transferência do DNA plasmideano (Courvalin *et al.*, 1995; Sizemore *et al.*, 1995).

Nestes mecanismos de transferência, a bactéria invade a célula eucariótica em uma vesícula primária que, logo após, é fundida a um compartimento lisossômico, ocorrendo a lise bacteriana. Em seguida, o DNA plasmideano pode, então, escapar da vesícula para o citoplasma e, por fim, ser translocado para o núcleo da célula; local onde

ocorre a expressão da ORF de interesse para posterior apresentação ao sistema imune (Figura 4) (Pontes *et al.*, 2011; Schoen *et al.*, 2004).

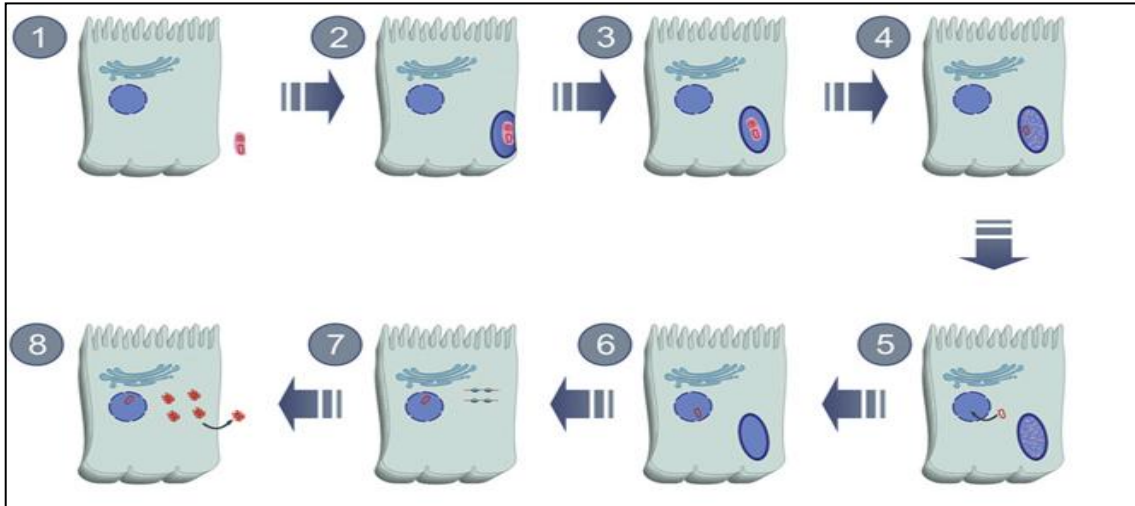


Figura 4: Representação esquemática da transferência de plasmídeos de vacinas de DNA por bactérias às células mamíferas. 1) Célula eucariótica próxima a uma bactéria carregando um plasmídeo de expressão eucariótica; 2) entrada da bactéria na célula; 3) escape das bactérias do fagolisossomo; 4) lise bacteriana; 5) liberação do plasmídeo no citoplasma; 6) transferência dos plasmídeo para o núcleo da célula; 7) expressão da ORF de interesse no núcleo da célula e 8) síntese do antígeno de interesse e apresentação do mesmo ao sistema imune (Adaptado de Pontes *et al.*, 2011).

Neste sistema de entrega, as bactérias atravessam a membrana plasmática da célula alvo, entregando o plasmídeo vacinal diretamente no interior da célula, além de proteger o DNA plasmídeo de degradação por nucleases.

Comparado à maioria dos vírus que são utilizados como carreadores de vacinas de DNA, o uso de bactérias é vantajoso pela facilidade de cultivo e à manutenção dos plasmídeos devido a sua elevada capacidade de multiplicação. Além disso, em contraste com a imunização utilizando DNA nu, as etapas de purificação do plasmídeo não são necessárias, reduzindo os custos de produção e estocagem. Por fim, as bactérias apresentam um tropismo natural pela indução do sistema imunológico, por gerar “sinais de perigo” ao hospedeiro; o que leva a uma ativação mais eficiente do sistema imunológico, em relação à imunização com DNA nu (Schoen *et al.*, 2004).

Aspectos imunológicos

Embora o mecanismo de indução da imunidade por vacinas de DNA ainda permaneça incerto, o aumento lento da resposta imune após a vacinação com DNA sugere que este siga um caminho complexo que pode mimetizar a infecção viral natural. Acredita-se que uma vez que o DNA plasmideano se encontre internalizado pela célula, estes utilizam a rede de microtúbulos e suas proteínas motoras associadas para o tráfego através do citoplasma para o núcleo (Vaughan e Dean, 2006) e a transcrição é iniciada utilizando o maquinário celular do hospedeiro (Kutzler e Weiner, 2008). Diferentemente das vacinas inativadas ou de subunidade, as vacinas de DNA resultam em uma exibição antigênica via moléculas de MHC I e MHC II, assim como uma infecção natural, ativando linfócitos T CD8+, T CD4+ e a produção de anticorpos.

Com poucas exceções, a maioria das linhagens bacterianas utilizadas no transporte e entrega de plasmídeos vacinais são patógenos intestinais humanos atenuados. O uso de bactérias entéricas humanas é particularmente vantajoso devido a sua capacidade de infectar a mucosa intestinal após a administração oral. Além disto, estas bactérias também são transportadas por células M até as APCs nos tecidos linfoides intestinais, as quais se propagam para linfonodos, baço e fígado (Schoen *et al.*, 2004). Assim, as bactérias utilizadas para imunização com DNA são capazes de agir como adjuvantes naturais após entrarem em contato com a célula hospedeira, devido à presença de padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), capazes de modular a resposta imune inata e promover uma resposta adaptativa robusta e duradoura (Hoebe *et al.*, 2004).

As DCs, consideradas as principais células alvo para o processamento antigênico, desempenham um papel central na captação e defesa contra patógenos entéricos. Além de residirem como células imaturas nas PP, as DCs são capazes de ultrapassar as junções entre as células epiteliais, engolfando diretamente as bactérias fora do epitélio, controlando o conteúdo do lúmen intestinal (Rescigno *et al.*, 2001). Neste caso, após a ingestão da bactéria, o DNA plasmideano, liberado no citoplasma da DC, pode atingir o núcleo, onde é então expresso. Assim, o antígeno é reconhecido como endógeno e é, então, apresentado ao sistema imunológico via moléculas MHC I, com a ativação de linfócitos T CD8+. Portanto, bactérias entéricas são altamente capazes de entregar vacinas de DNA às DCs (Paglia *et al.*, 1998).

Desta forma, o antígeno codificado pelo plasmídeo vacinal é produzido tanto por células infectadas como, por exemplo, enterócitos, quanto por APCs. O peptídeo antigênico apresentado por células infectadas nucleadas via MHC I são então capturadas por outras APCs para posterior processamento e apresentação via MHC II, para ativação de linfócitos T CD4+ e linfócitos B (Schoen *et al.*, 2004).

A ativação inicial de células T e B é pequena, mas, uma vez que essas células migram de volta para o tecido transfectado, elas podem sofrer re-estimulação. Neste ponto, as células T CD8+ podem lisar as células transfectadas que apresentam o peptídeo antigênico, levando a liberação de mais antígenos, repetindo o ciclo de ativação (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001).

Neste contexto, os diferentes tipos de resposta imune induzida pela imunização genética justificam sua aplicação nos campos das doenças infecciosas, das alergias e dos tumores. Tanto uma resposta tipo Th1 quanto Th2 podem ser induzidas, dependendo da via de entrega da vacina de DNA, do antígeno utilizado e da formulação, podendo ser empregada para controle de infecções intracelulares, como leishmaniose, tuberculose, toxoplasmose, brucelose e listeriose, assim como direcionado ao controle de infecções extracelulares, como esquistossomose e outras doenças (Azevedo e Oliveira, 2003).

II.1.3.3 Bactérias patogênicas utilizadas para a entrega de vacinas de DNA

Atualmente, bactérias patogênicas intracelulares atenuadas têm sido utilizadas para a entrega de vetores de expressão eucariótica em células de mamíferos (Daudel *et al.*, 2007). Dentre estas, podemos citar *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli* (Schoen *et al.*, 2004). Contudo, esses organismos apresentam riscos de reversão da patogenicidade, não sendo totalmente seguros para uso humano, especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (Dunham, 2002). Neste contexto, o uso de bactérias não patogênicas, assim como diversos representantes do grupo das Bactérias Lácticas, como um veículo para a entrega de plasmídeos vacinais, representa uma alternativa atrativa em relação aos patógenos atenuados (Wells e Mercenier, 2008).

II.2 Bactérias Lácticas

II.2.1 Características das Bactérias Lácticas

As Bactérias Lácticas (BL) constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos, microaerófilos, não formadores de esporos e não móveis, capazes de converterem açúcares (hexoses) em ácido láctico (Makarova e Koonin, 2007). Atualmente, onze gêneros bacterianos entre cocos e bastonetes que possuem uma porcentagem G+C no genoma inferior a 54%, compõem o grupo das BL: *Carnobacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Oenococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Tetragenococcus spp.*, *Vagococcus spp.* e *Weissella spp.* (Stiles e Holzapfel, 1997).

As BL são um dos mais importantes grupos de bactérias utilizadas industrialmente. Estes organismos são usados em uma variedade de processos, incluindo produção de alimentos fermentados, como iogurtes, queijos, leites acidófilos, pães, manteiga, vinhos, carnes, embutidos, pickles e silagem (Carr, Chill e Maida 2002), atuando na formação do sabor (Urbach, 1995), na preservação (Stiles, 1996) e na produção de suplementos ou aditivos (Hugenholtz *et al.*, 2002), na produção de bacteriocinas (De Vuyst e Leroy, 2007) e exopolissacarídeos (Welman e Maddox, 2003). Estas também são utilizadas para a produção de consideráveis volumes de químicos, como o próprio ácido láctico (Kwon *et al.*, 2001) e vitamina B (Burgess *et al.*, 2004).

A estes microrganismos ainda é dado um importante papel na manutenção da saúde e da prevenção de infecções (Reid *et al.*, 2003; Klaenhammer *et al.*, 2005), referidos como probióticos, ou seja, “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (Sanders, 2003). Alguns dos efeitos benéficos dos probióticos incluem exclusão de agentes patogênicos e redução de agentes cancerígenos (Reid *et al.*, 2003). Outros efeitos bem estabelecidos destas bactérias é a propriedade imunoestimulatória, com efeitos anti-inflamatórios capazes de prevenir e tratar certas doenças inflamatórias intestinais e alérgicas (LeBlanc *et al.*, 2008). Atualmente, uma série de produtos lácteos, contendo probióticos, está disponível no mercado, sendo os leites fermentados os produtos mais difundidos (Miyoshi *et al.*, 2010).

Recentemente, o potencial para as novas aplicações das BL, tais como vacinas orais (Steidler *et al.*, 2000), produção de proteínas heterólogas e metabólitos, vem sendo explorado por vários grupos de pesquisa. Neste contexto, estas bactérias são utilizadas como “usinas celulares” para a produção de moléculas de interesse biotecnológico, como citocinas, enzimas, alérgenos e antígenos (Nouaille *et al.*, 2003; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2004) e também utilizadas como veículo para a apresentação de antígenos exógenos na superfície de mucosas (Mercenier *et al.*, 2000).

II.2.2 *Lactococcus lactis*: a bactéria láctica modelo

Dentre todas as BL, *Lactococcus lactis* é a espécie mais bem caracterizada e figura como organismo modelo no estudo das mesmas; não só pela sua importância econômica, mas também devido ao fato de: (i) ser um microrganismo de fácil manipulação; (ii) ser um microrganismo seguro, possuindo o status GRAS (*Generally Recognized As Safe*); (iii) ter sido a primeira BL cujo genoma foi seqüenciado e (iv) possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (Duwat *et al.*, 2000; Bolotin *et al.*, 2001; Nouaille *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2006), como protocolos de transformação, vetores de clonagem e expressão (Poquet *et al.*, 1998; Ravn *et al.*, 2000).

Existem duas subespécies de *L. lactis*, *L. lactis* ssp. *lactis* e *L. lactis* ssp. *cremoris* (Schleifer *et al.*, 1985). As duas subespécies têm sido intensamente estudadas, principalmente devido ao interesse industrial e por serem excelentes modelos para o estudo do metabolismo, fisiologia, genética e biologia molecular das BL (Bolotin *et al.*, 2001). Além disto, durante as duas últimas décadas, avanços significativos na área da genética e sistemas de expressão de proteínas em *L. lactis* (Nouaille *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2006) possibilitaram o aparecimento de novas áreas de aplicação desta bactéria (Braat *et al.*, 2006; Hanniffy *et al.*, 2007; Bahey-El-Din *et al.*, 2010b).

II.2.3 Utilizações biotecnológicas de *Lactococcus lactis*

Dentre as aplicações extras alimentares vislumbradas para *L. lactis*, pode-se citar: (i) a produção de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico em fermentadores ou diretamente nos alimentos e (ii) a construção de vacinas vivas de mucosas, seja como produtoras de proteínas diretamente no hospedeiro (Miyoshi *et al.*,

2004) ou (iii) como um carreador para entrega de vacinas gênicas (Guimarães *et al.*, 2006).

II.2.3.1 Produção de proteínas em *Lactococcus lactis*

A expressão de proteínas heterólogas em *L. lactis* foi alcançada tanto pelo desenvolvimento do conhecimento genético quanto pelo desenvolvimento de técnicas de biologia molecular. Através deste dueto e a fim de obter níveis elevados e controlados de produção, vários vetores contendo promotores constitutivos ou indutivos foram desenvolvidos e, hoje, constituem a base de todos os sistemas de expressão voltados para *L. lactis* (Nouaille *et al.*, 2003).

Muitos sistemas de expressão vêm sendo desenvolvidos para a produção de proteínas recombinantes, sendo que dentre os sistemas procariotos, os mais altos níveis protéicos são obtidos utilizando *E. coli* (Jana e Deb, 2005). Entretanto, a estratégia de produção mais comumente utilizada neste microrganismo é a intracelular (periplasma ou citoplasma); o que envolve processos caros de purificação e, muitas vezes, problemáticos. Além disso, endotoxinas como, por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS), ainda devem ser retiradas das amostras protéicas a serem administradas a mamíferos (Morello *et al.*, 2008).

Neste sentido, *L. lactis* se destaca como um microrganismo alternativo para a produção de moléculas de interesse biotecnológico, em relação ao uso de modelos como *E. coli*. Inúmeras proteínas de origem eucariótica, bacteriana e viral já foram produzidas utilizando *L. lactis* (Nouaille *et al.*, 2003; Le Loir *et al.*, 2005).

Além disto, *L. lactis* apresenta propriedades interessantes que a torna ideal para a produção de moléculas exógenas. *L. lactis*, além de não produzir LPS, não apresenta qualquer outro produto metabólico tóxico (Bolotin *et al.*, 2001; Bahey-El-Din e Gahan, 2010a). Ainda apresenta poucas proteínas secretadas, sendo que, apenas uma, a Usp45 (*Unknown Secreted Protein of 45 kDa*) é secretada em quantidades suficientes para ser detectada em gel de poliacrilamida desnaturante (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) corado pela técnica “azul de Coomassie” (van Asseldonk *et al.*, 1990); característica esta que facilita a análise e a purificação das proteínas de interesse. Mais ainda, as linhagens utilizadas não possuem

a protease extracelular PrtP (Gasson, 1983a) e são desprovidas de plasmídeos selvagens (linhagens IL1403 e MG1363) (Gasson, 1983b; Chopin *et al.*, 1984).

Vários sistemas de expressão e de endereçamento celular de proteínas heterólogas já foram desenvolvidos, não só para uso em *L. lactis*, mas também em outras BL (Norton *et al.*, 1995; Piard *et al.*, 1997; Dieye *et al.*, 2001; Le Loir *et al.*, 2001). Dentre os sistemas de expressão, pode-se destacar o sistema NICE (*Nisin Controlled Expression System*) e o sistema XIES (*Xylose-Inducible Expression System*) (de Vos e Gasson, 1989; Wells *et al.*, 1993a; de Vos, 1999; Miyoshi *et al.*, 2004).

II.2.3.2 *Lactococcus lactis* como vacinas vivas de mucosas

Recentemente, as BL, destacando-se, novamente, *L. lactis*, vêm sendo utilizadas como veículo para a apresentação de antígenos e para entrega de DNA na superfície de mucosas. As BL, ao contrário dos microrganismos patogênicos, podem ser continuamente utilizadas em programas de imunização. Além disto, são capazes de resistir ao ambiente ácido do estômago, alcançando o trato gastrointestinal, onde ocorre a estimulação temporária do sistema imune. Já que é uma bactéria transiente, a mesma não é capaz de colonizar a mucosa intestinal (Mercenier *et al.*, 2000), não gerando, assim, tolerância oral.

Vários trabalhos confirmam a capacidade de *L. lactis* em apresentar antígenos para a mucosa, gerando respostas imunes específicas (Chatel *et al.*, 2001). A maioria dos estudos sobre *L. lactis*, como uma vacina viva, foram feitos utilizando o fragmento C da toxina tetânica (TTFC, *Tetanus Toxic Fragment C*), um antígeno altamente imunogênico, sendo verificado um aumento significativo nos níveis de IgA, após a imunização oral dos camundongos com as linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras deste antígeno (Norton *et al.*, 1995). Outros trabalhos mostraram que os animais vacinados com *L. lactis* produtora da forma intracelular do TTFC desenvolveram altos níveis de IgG e IgA específicos. Posteriormente, esses animais tornaram-se resistentes ao desafio com a toxina tetânica (Wells *et al.*, 1993b; Robinson *et al.*, 1997).

Contudo, o maior desafio consiste, principalmente, na expressão de genes eucarióticos nesta bactéria. O processamento pós-traducional em *L. lactis*, algumas vezes, não é correto, pois modificações tais como glicosilações e formação de pontes

dissulfeto são limitadas devido à falta da enzima dissulfeto isomerase. Isto resulta em uma quantidade muito baixa da forma ativa da proteína de interesse. Esse fato foi observado tanto para a IL-12 (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2003a) quanto para o interferon omega ovino (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2003b).

Assim, uma estratégia alternativa para contornar este problema poderia se basear no uso destas bactérias para a entrega de plasmídeos vacinais a células eucarióticas; o que representaria um novo passo rumo ao desenvolvimento de novas formulações para as vacinas gênicas.

II.2.3.3 *Lactococcus lactis* como carreador de vacinas gênicas

Guimarães *et al.* (2006) utilizaram *L. lactis* nativas para entregar, a células de mamíferos, um cassete de expressão eucariótico da proteína antigênica β -lactoglobulina bovina (BLG; a mais abundante proteína do soro do leite de vaca e considerada um alérgeno dominante). O cocultura da linhagem celular humana epitelial Caco-2 e *L. lactis*, contendo um plasmídeo com o cassete de expressão para BLG, confirmou a capacidade de microrganismo em entregar o DNA às células de mamíferos, levando à expressão e secreção da proteína BLG pelas mesmas. *L. lactis* nativas foram ainda capazes de entregar este cassete de expressão eucariótica a camundongos, *in vivo*, sendo a proteína BLG detectada na membrana epitelial do intestino delgado de 53% dos camundongos testados (Chatel *et al.*, 2008).

Com o objetivo de aumentar a eficiência de entrega do cassete de expressão eucariótico às células, uma nova estratégia foi desenvolvida. Esta estratégia consistiu na utilização de linhagens recombinantes de *L. lactis* capazes de invadir e entregar plasmídeos vacinais às células epiteliais humanas. Após a invasão celular, *L. lactis*, provavelmente, é internalizado por vesículas fagolisossomais e sofre lise, liberado o DNA plasmideano que é, então, transferido para o núcleo, resultando na expressão da ORF de interesse (Guimarães *et al.*, 2005). A proteína antigênica ou peptídeo de interesse expresso na célula infectada é apresentado ao sistema imune, ativando células T e B nos linfonodos (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001).

Para tanto, Guimarães *et al.*, 2005 construíram uma linhagem de *L. lactis* invasiva, expressando o gene da internalina A (*InlA*) de *Listeria monocytogenes*. *InlA* codifica uma proteína de 84 kDa que fica ancorada à parede celular, mediando a entrada

deste patógeno em células epiteliais de mamíferos por se ligar à E-caderinas presentes nas mesmas (Gaillard *et al.*, 1991; Lebrun *et al.*, 1996). Foi demonstrado que a proteína InlA foi eficientemente ancorada ao envelope celular em *L. lactis*, promovendo, assim, sua internalização por células humanas epiteliais (Caco-2), *in vitro*, e por enterócitos, *in vivo*, após administração oral em porcos-da-índia. Além disso, essa internalização promoveu a entrega do plasmídeo e expressão da ORF da Proteína Verde Fluorescente (GFP, *Green fluorescent protein*) em cerca de 1,3% das células Caco-2, tendo sido esta proporção verificada por citometria de fluxo (Guimarães *et al.*, 2005).

Além disto, um novo plasmídeo chamado pValac (*Vaccination using Lactic acid bactéria*), com peso molecular de 3.742 pb, foi construído. O pValac foi formado pela fusão do (i) promotor do citomegalovirus (pCMV) que permite a expressão do antígeno em células eucarióticas, (ii) sítio de clonagem múltipla, (iii) seqüência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento (BGH poli-A), para estabilizar o transcrito de RNA mensageiro, (iii) origens de replicação que permitem a propagação do plasmídeo tanto em *E. coli* (RepC) quanto em *L. lactis* (RepA) e (iv) um gene de resistência ao cloranfenicol para a seleção das linhagens recombinantes (Guimarães *et al.*, 2009).

Contudo, embora atraente, a utilização experimental de *L. lactis* expressando InlA em camundongos tem uma grande limitação: InlA não interage com a E-caderina murina. Assim, a estratégia de se utilizar *L. lactis* InlA como um veículo para a entrega de DNA só pode ser testado em cobaias que expressem a E-caderina humana, como porcos da índia, ou em camundongos transgênicos (Lecuit *et al.*, 2001); o que dificulta, em muito, os testes *in vivo*.

Neste contexto, outra linhagem recombinante de *L. lactis*, expressando a Proteína de Ligação Fibronectina A (FnBPA) de *Staphylococcus aureus* (Que *et al.*, 2001), foi testada com o objetivo de melhorar e facilitar a entrega do DNA a células de mamíferos (Innocentin *et al.*, 2009). FnBPA medeia a adesão da bactéria ao tecido hospedeiro e sua entrada em células não fagocíticas, sendo *L. lactis* FnBPA capaz de invadir células *in vitro* a níveis comparáveis a *S. aureus* (Sinha *et al.*, 2000). Além disto, foi demonstrado que a capacidade invasiva de *L. lactis* expressando FnBPA é comparável à observada em *L. lactis* expressando InlA, utilizando a linhagem celular humana epitelial Caco-2 (Innocentin *et al.*, 2009). A linhagem invasiva foi ainda transformada com o plasmídeo pValac:*gfp* para avaliação de sua capacidade de entrega,

in vitro, do plasmídeo de expressão eucariótica funcional. Assim, foi observada a presença da GFP em aproximadamente 1% das células Caco-2 co-incubadas com a linhagem invasiva, versus 0,02% de células produtoras de GFP co-incubadas com a linhagem não invasiva de *L. lactis* (Innocentin *et al.*, 2009).

Posteriormente, foi novamente confirmada sua maior capacidade de entrega, *in vitro*, utilizando-se para isto o pValac:BLG. Foi verificado que após a cocultura de células Caco-2 com a linhagem *L. lactis* FnBPA e *L. lactis* selvagem, a invasiva mostrou-se cerca de 10x mais internalização, além de *L. lactis* FnBPA(pValac:BLG) levar a 30x mais produção da proteína BLG comparada à cocultura com *L. lactis* (pValac:BLG) (Pontes *et al.*, 2012). Em adição, utilizando-se a linhagem *L. lactis* FnBPA(pValac:gfp) para gavagem oral de camundongos, foi confirmado por microscopia de fluorescência que a ORF *gfp* foi expressa em algumas células do intestino delgado (Pontes *et al.*, 2012) e também do intestino grosso (Del Carmen *et al.*, 2013); o que confirma o potencial uso de *L. lactis* invasiva como veículo para a entrega de DNA, *in vivo*.

Além disto, foi comparado o perfil de resposta imune gerado, *in vivo*, após imunização utilizando as linhagens selvagem e invasiva de *L. lactis* (FnBPA), todas carreando pValac:BLG; sendo estas capazes de gerar uma resposta imune específica após administração oral e intranasal das bactérias (Pontes *et al.* 2014).

Assim, estas estratégias combinam as vantagens da imunidade de mucosas com a simplicidade da técnica e o baixo custo da vacina de DNA, além da segurança de utilização destas bactérias que são consideradas não patogênicas (Guimarães *et al.*, 2005).

Nesse contexto, a utilização de uma linhagem invasiva de *L. lactis* para a entrega de um plasmídeo de expressão eucariótica, expressando um antígeno de interesse, poderia representar uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacinas de DNA, mais seguras e econômicas, para o controle de diversas doenças infecciosas como, por exemplo, a tuberculose.

II.3 *Mycobacterium tuberculosis* e a Tuberculose

II.3.1 *Mycobacterium tuberculosis*

O agente causador da Tuberculose (TB), *Mycobacterium tuberculosis*, foi isolado pela primeira vez em 1882, por um bacteriologista alemão chamado Robert Koch. Porém, cento e trinta anos após esta descoberta, um terço da população mundial (aproximadamente 2 bilhões de pessoas) ainda se encontra infectada com o bacilo, em estado latente, sendo que, 10% destas, desenvolvem a TB ativa durante a vida (Pieters, 2008). Este fato torna esta doença um dos principais problemas sociais, econômicos e de saúde pública no mundo (Lugo e Bewley, 2008).

M. tuberculosis, pertence à família Mycobacteriaceae e ao grupo dos actinomicetos, sendo que as características típicas deste bacilo Gram-positivo incluem o alto conteúdo C+G (61-71%), crescimento lento, dormência, patógeno intracelular, homogeneidade genética e complexo envelope celular, composto principalmente de peptidoglicanos, arabinogalactano e ácidos micólicos (Wheeler e Ratledge, 1994), além de imóvel, aeróbio estrito que não esporular (Dorella *et al.*, 2006). É necessário recorrer à técnica de coloração especial (Ziehl-Neelsen) para a visualização das células de *M. tuberculosis*, pois a coloração pela técnica de Gram é ineficaz devido aos ácidos micólicos presentes na parede celular desse bacilo. Bioquimicamente, o bacilo é classificado como catalase positivo, arilsulfatase positivo e resistente à lisozima (Holt *et al.*, 1994).

As micobactérias estão amplamente distribuídas no solo e na água, sendo uma pequena parte encontrada em animais, como patógenos intracelulares. *M. tuberculosis*, juntamente com *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium canettii*, podem causar a TB, sendo *M. tuberculosis* o principal agente etiológico da TB humana (Pfyffer *et al.*, 1998; Barrera, 2007).

Desde o seu isolamento em 1905, a linhagem *M. tuberculosis* H37Rv tem sido mundialmente utilizada em pesquisas, pelo fato desta manter plena virulência em modelos animais, ser suscetível a drogas e ser propícia à manipulação genética, além de ter seu genoma sequenciado (4.411.529 pb), com a anotação publicada em 1998 (Cole *et al.*, 1998) e a re-anotação em 2002 (Camus *et al.*, 2002).

II.3.2 Patologia e imunologia da doença

A TB é uma doença transmitida através do ar por meio de gotículas de secreção (aerossóis) contendo bacilos viáveis que são eliminados através da fala, tosse ou espirro de uma pessoa que contém a doença ativa. Quando estas gotículas são inaladas por pessoas saudáveis, provocam a infecção tuberculosa e o risco de desenvolver a doença. Os bacilos multiplicam-se nos alvéolos e um pequeno número entra na circulação sanguínea disseminando-se por todo o corpo. Dentro de 2 a 10 semanas, no entanto, o sistema imune, usualmente, impede que os bacilos continuem a se multiplicar pela formação de uma barreira, o granuloma, que mantém os bacilos sob controle (Brasil, 2002).

A TB acomete mais comumente o trato respiratório inferior, sendo os pulmões os sítios primários da infecção. Mais raramente, *M. tuberculosis* também infecta outras regiões do corpo como o sistema nervoso central (Rock *et al.*, 2008), ossos (Yoshida *et al.*, 2009), rins (Gurski e Baker, 2008), trato geniturinário (Vilasaró *et al.*, 2008), laringe, articulações, pele (Lúpus Vulgaris), glânglios linfáticos (Escrófulo), olho, pleura e trato gastrointestinal (Brasil, 2002b). A tuberculose miliar consiste no alastramento da infecção para diversas partes do organismo, por via sanguínea. Este tipo de TB pode atingir as meninges (membranas que revestem a medula espinal e o cérebro) causando infecções graves denominadas de “meningite tuberculosa” (Palomino *et al.*, 2007). O desenvolvimento da infecção depende de vários fatores como, por exemplo, a virulência da linhagem, as condições imunológicas e características genéticas do indivíduo exposto (Dannenberg, 1989).

A TB pulmonar ativa se caracteriza por tosse, expectoração, falta de apetite, emagrecimento, cansaço e febre baixa vespertina seguida de suores noturnos. Dificuldade na respiração (dispneia), eliminação de sangue (hemoptise) e acúmulo de pus na pleura pulmonar são característicos em casos mais graves (Brasil, 2005).

A infecção pelo *M. tuberculosis* ocorre através de APCs presentes nos pulmões, geralmente macrófagos alveolares, responsáveis por capturar o bacilo e transportá-lo através do epitélio alveolar (Wolf *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2011). A resposta imune inata inicial leva ao recrutamento progressivo de neutrófilos, monócitos inflamatórios, macrófagos intersticiais e DCs no pulmão, formando-se o granuloma (Davis e Ramakrishnan, 2009).

No interior dos macrófagos, *M. tuberculosis* apresenta múltiplos mecanismos de virulência, sendo capaz de parar o fagossomo nos estágios iniciais de maturação, impedindo a fusão com o lisossomo (Harth e Horwitz, 1999; Ferrari *et al.*, 1999). Além disto, *M. tuberculosis* é capaz de inibir apoptose das células infectadas, acumulando-se um grande número de bactérias antes de promover a necrose celular através de proteínas secretadas nos estágios iniciais da infecção. Assim, células fagocíticas são recrutadas, mas acabam sendo infectadas, contribuindo para expansão da infecção bacteriana (Davis e Ramakrishnan, 2009; Miller *et al.*, 2010; Blomgran *et al.*, 2012). Desta forma, *M. tuberculosis* explora os primeiros estágios da formação do granuloma para proliferação e disseminação no hospedeiro, se espalhando de célula a célula; o que, conseqüentemente, resulta na ativação da resposta adaptativa (Ramakrishnan, 2012; Ernst, 2012).

A resposta adaptativa é ativada tardiamente após a infecção, pois *M. tuberculosis* é capaz de inibir a migração de DCs até os linfonodos (Wolf *et al.*, 2008; Blomgran e Ernst, 2011). Além disto, a inibição da apoptose neutrofílica também contribui para o atraso na ativação da resposta imune adaptativa contra o bacilo (Blomgran *et al.*, 2012). Porém, esta resposta é limitada, pois, na maioria das vezes, a bactéria entra em um estado de latência que dificulta a sua eliminação do organismo pelo sistema imunológico (Lillebaek *et al.*, 2003; Ernst, 2012)

As APCs podem apresentar os antígenos de *M. tuberculosis* pela via exógena (MHC II) e, devido aos processos de resistência do bacilo, também pela via endógena (MHC I), ambas levando a ativação de linfócitos (Kaufmann, 1999), sendo as DCs infectadas as principais responsáveis pela ativação de células T, centrais para o controle da TB.

Diferentes populações de células T atuam na resposta à infecção por *M. tuberculosis* (Kaufmann, 2000). As células T CD4⁺ (auxiliares) ativas migram para o local da infecção e, de acordo com as citocinas presentes no ambiente, são capazes de se diferenciar em efetores do tipo Th1 ou Th2. A citocina IL-12, secretada pelas células dendríticas infectadas pelo bacilo, diferencia as células T CD4⁺ em células efetoras do tipo Th1. Além disso, IL-12 participa do processo de ativação das células NK. As células T CD4⁺ do tipo Th1 e as células NK ativadas passam, então, a produzir IFN- γ , responsável pela ativação das funções microbicidas dos macrófagos (Kaufmann, 2004; Flynn, 2004; Salgame, 2005) através da produção de intermediários reativos de

oxigênio (ROI, *Reactive Oxygen Intermediates*) e intermediários reativos de nitrogênio (RNI, *Reactive Nitrogen Intermediates*) (Schaible, Collins e Kaufmann, 1999; Schaible *et al.*, 1998). Além disto, as citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor alpha*), linfotoxina- α (LT- α) e IL-17 também participam do controle da infecção por *M. tuberculosis* (Kaufmann, 2001; Cooper, 2009). Por outro lado, as citocinas IL-4 e IL-10 são escassas, mas não totalmente ausentes, na resposta imunológica contra o *M. tuberculosis* (Lin *et al.*, 1996).

Células que também participam da resposta imune celular adaptativa são os linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos). Esses linfócitos podem produzir IFN- γ , mas sua principal função é a liberação de grânulos líticos (granzimas), através de canais de perforina, ativando as caspases e, assim, eliminando as células infectadas pelo *M. tuberculosis* por indução apoptótica (Canaday *et al.*, 2001; Kaufmann, 2002; Nicod, 2007).

Além das células T CD4⁺ e T CD8⁺, células T não convencionais como células T restritas a CD1 e as células T $\gamma\delta$ também participam da resposta imune protetora, estimuladas por antígenos não protéicos, como glicolípídeos (ácidos micólicos, por exemplo) e fosfoligantes, abundantes na parede celular micobacteriana (Kaufmann, 2000). Estas células T produzem IFN- γ após a estimulação por estas moléculas, mas sua principal função é a atividade citolítica (Stenger, Niazi e Modlin, 1998; Behr-Perst *et al.*, 1999).

Como foi constatado, a resposta imune mediada por células possui um papel central para o controle da infecção. Como *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular, pode-se pensar que a imunidade humoral não contribui para a proteção. Entretanto, quando a doença é disseminada para outros órgãos, anticorpos específicos contra os bacilos, localizados no meio extracelular, podem ser detectados. Os anticorpos se ligam às micobactérias e a fagocitose desses bacilos opsonizados (envolvidos pelos anticorpos) aumenta a capacidade microbicida de células fagocíticas e estimula a resposta imune celular (Hoft, 2008).

Em pessoas com imunidade celular intacta, a infecção micobacteriana é caracterizada pela formação de granulomas, formados por uma área central de necrose circundada por macrófagos infectados, linfócitos T CD4⁺, em maior quantidade, e T CD8⁺, em menor quantidade, e um pequeno influxo de linfócitos B distribuídos periféricamente. Os bacilos, uma vez delimitados, permanecem em estado quiescente ou

dormente, conservando ainda a capacidade de replicação e disseminação. Quando o microrganismo está contido dentro do granuloma, a doença é assintomática. Cerca de 90% das pessoas infectadas apresentam o bacilo em sua forma latente no organismo dentro dos granulomas (Figura 5) (Russel, 2007).

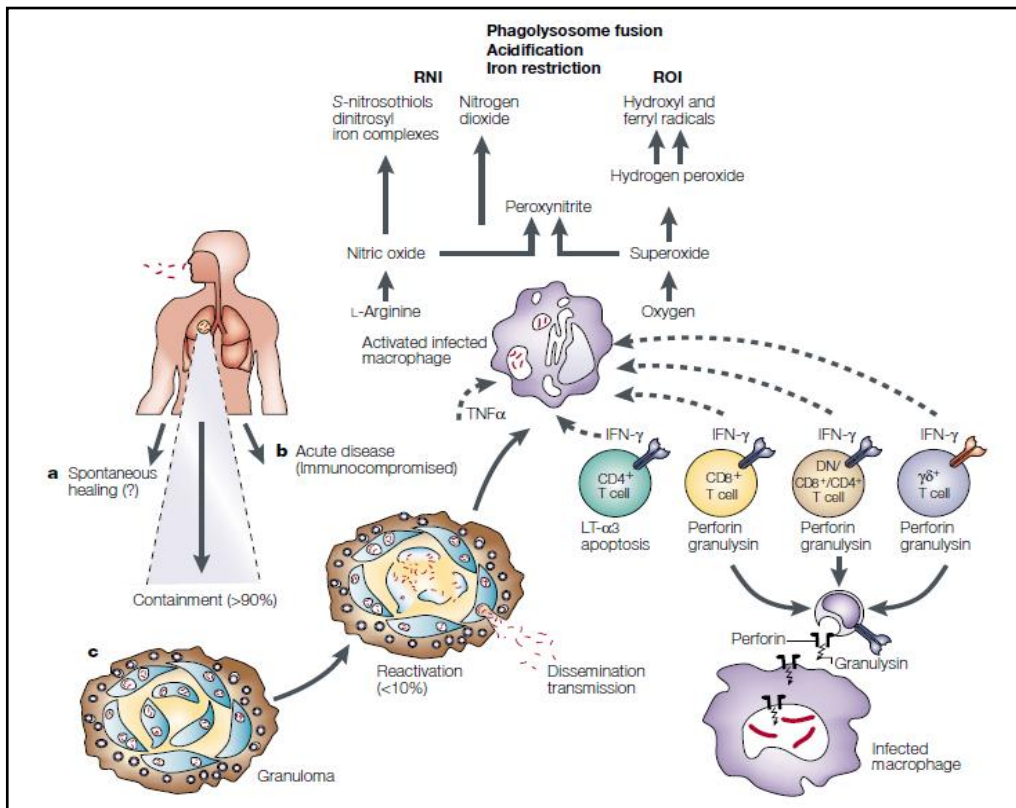


Figura 5: Representação esquemática dos processos envolvidos na infecção, no curso da doença e nos mecanismos imunes ativados durante infecção pelo *M. tuberculosis*. Existem três potenciais destinos da infecção por *M. tuberculosis* em humanos: a) A infecção pode ser controlada e haver cura espontânea, b) A infecção pode levar à doença ativa em indivíduos imunocomprometidos, c) Na maioria dos casos, a infecção é inicialmente contida, mas posteriormente pode ser reativada. O granuloma é o sítio de infecção, persistência, patologia e proteção. Células T efetoras, como as convencionais CD4 e CD8, além das células T $\gamma\delta$ e das células T restritas a CD1 e macrófagos participam do controle da TB. Interferon- γ (IFN γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), produzidos por células T, são importantes na ativação de macrófagos. A ativação de macrófagos permite a maturação fagossomal e a produção de moléculas antimicrobianas como intermediários reativos de oxigênio (RNI) e intermediários reativos de oxigênio (ROI). LT- $\alpha 3$, linfotóxina- $\alpha 3$ (Adaptado de Kaufmann, 2001).

A contenção do bacilo geralmente falha quando a resposta imune do hospedeiro está comprometida, como em pacientes onde a população de células T CD4+ está diminuída (Silva *et al.*, 2001; Russel, 2007) ou em casos de terapia de neutralização de TNF- α (Harris e Keane, 2010). Desse modo, o granuloma é rompido, espalhando os bacilos para os diversos tecidos. A doença é, então, reativada e o paciente torna-se contagioso (Wallis, 2007). Isto pode ocorrer logo após a infecção (TB primária, 5% dos casos) ou vários anos após a infecção (reativação da doença ou bacilo dormente, 5% dos casos) (Brasil, 2005). A importância de linfócitos T CD4+ na modulação do granuloma pode ser visualizada no fato de que, em pacientes com AIDS, frequentemente, não se observa a formação do granuloma no foco da infecção e, conseqüentemente, esses pacientes podem desenvolver a TB na forma disseminada que é muito grave (Beck, 2005; Clay, Volkman e Ramakrishnan, 2008).

II.3.3 Epidemiologia da Tuberculose

A estimativa da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, WHO) é que mais de oito milhões de pessoas contraíam TB, por ano, e que, aproximadamente, dois milhões morram, anualmente, em todo o mundo em decorrência desta doença (Dye *et al.*, 1999; Zumla *et al.*, 2000; Frieden *et al.*, 2003; WHO, 2006).

A TB é uma doença infecto-contagiosa que está intimamente associada à pobreza, sendo que, 95% de todos os casos e 99% das mortes, ocorrem em países em desenvolvimento (Dye, 2006; WHO, 2006a) (Figura 5). As razões para a permanência da epidemia incluem a precariedade dos sistemas de saúde nos países pobres, inadequadas ferramentas de diagnóstico, aumentos dramáticos no surgimento de linhagens multidrogas resistentes e uma vacina com eficácia limitada (Derrick e Morris, 2007). Além disso, a epidemia da TB tem sido exacerbada, desde os anos 80, pela epidemia do HIV, sendo a causa principal de morbidade e mortalidade por adultos infectados com o vírus (McShane, 2005).

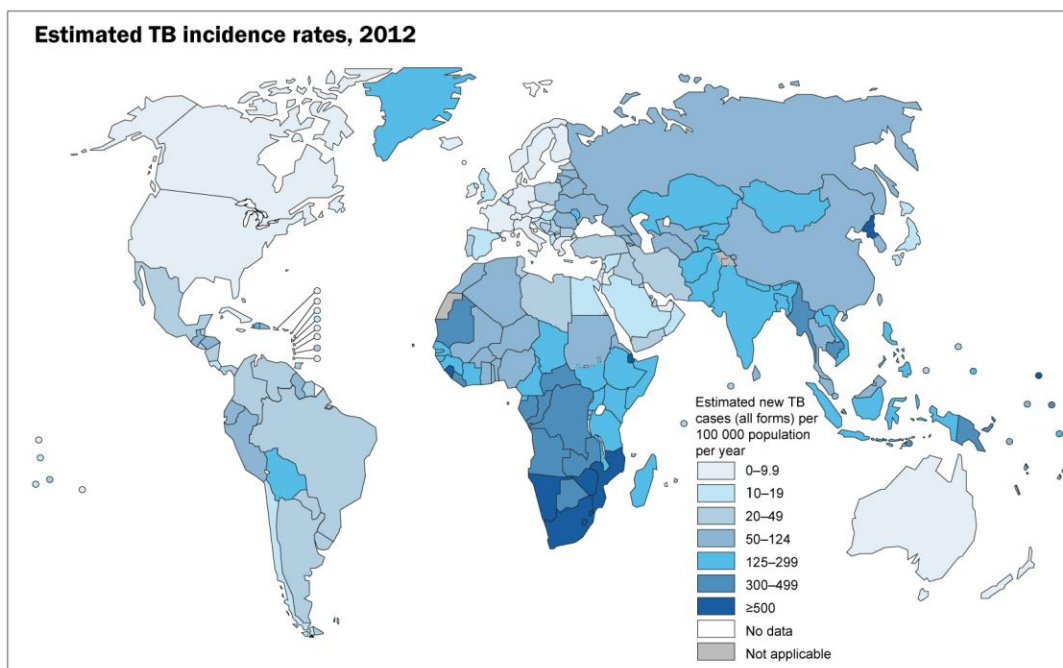


Figura 6: Incidência estimada da tuberculose no mundo. Taxa estimada de novos casos de tuberculose no mundo, para cada 100.000 habitantes, no ano de 2012. Fonte: Global Tuberculosis Report 2013. WHO, 2013. Disponível em (<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>)

No Brasil várias instituições estiveram envolvidas na luta contra a TB, como a Liga Brasileira Contra a Tuberculose, atual Fundação Aталpho de Paiva. Apesar das tentativas para controlar a doença, o Brasil ainda continua com altos índices de pessoas infectadas (Hijjar *et al.*, 2007). Assim, uma maior compreensão dos mecanismos de patogenicidade da bactéria é claramente necessária para o desenvolvimento de novas vacinas e medicamentos mais eficazes para o controle desta doença (Derrick e Morris, 2007).

II.3.4 Diagnóstico e tratamento

Um dos melhores prognósticos para a TB vem com o diagnóstico precoce da infecção e da aplicação imediata do tratamento adequado. Nos países em desenvolvimento, a maioria dos casos de diagnóstico da TB ativa depende de técnicas de coloração ou culturas positivas de *M. tuberculosis*, em conjunto com a avaliação dos sintomas clínicos e a evidência radiográfica (Bock *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1995;

Tattevin *et al.*, 1999). No entanto, estas avaliações são, geralmente, caras, cansativas e demandam muito tempo.

O método mais comum empregado para a detecção da infecção latente por *M. tuberculosis* é o teste intradérmico da Tuberculina (TST, *Tuberculin Skin Test*) utilizando o derivado protéico purificado (PPD, *Purified Protein derivative*). O PPD é baseado em uma mistura de antígenos de *M. tuberculosis*, muitos dos quais são compartilhados com as proteínas de outras micobactérias ambientais não patogênicas (Harboe, 1991; Huebner *et al.*, 1993). Portanto, pessoas que tiveram contato com outras espécies de micobactérias podem ter resultados falso-positivos (Pottumarthy *et al.*, 1999). Sendo assim, este teste é considerado clinicamente pouco confiável (Edwards *et al.*, 1969; Mustafa, 2002).

Novos testes, mais rápidos e eficientes para o diagnóstico da TB, têm sido desenvolvidos nos últimos anos (Brock *et al.*, 2001; Lalvani *et al.*, 2001a; Perkins, 2000). Testes sorológicos para detecção de anticorpos de *M. tuberculosis* apresentam um imenso potencial para um diagnóstico seguro e de baixo custo em países em desenvolvimento (Choudhary *et al.*, 2003). Nos últimos anos, numerosos antígenos de *M. tuberculosis* foram identificados, sendo capazes de gerar respostas anticorpo-específicas em pacientes com TB (Devi *et al.*, 2002; Houghton *et al.*, 2002, Ljungqvist *et al.*, 1990).

A quimioterapia padrão contra a TB, recomendada pela WHO, é denominada de TCPDO (Tratamento de Curto Prazo Diretamente Observado). Esta estratégia consiste em dois meses de tratamento com a administração das drogas anti-TB de primeira geração (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol), seguida por outra fase com a administração de isoniazida e rifampicina por mais quatro meses, totalizando seis meses de tratamento (WHO, 2005).

Entretanto, uma das dificuldades encontradas para o tratamento e o controle da TB é a ocorrência de linhagens multidrogas resistentes (MDR-TB, *Multi-drug-resistant tuberculosis*). Estas linhagens são resistentes a, pelo menos, isoniazida e rifampina. Além disso, há ainda linhagens extensivamente droga-resistentes (XDR-TB, *Extensively Drug-resistant Tuberculosis*), as quais resistem também à fluoroquinolona e a, pelo menos, um antibiótico de segunda linha como a amicacina, a canamicina e a capreomicina (Gandh *et al.*, 2006). Assim, os acometidos são tratados com as drogas de segunda geração (canamicina, amicacina, cicloserina, dentre outras). Um dos

inconvenientes da utilização das drogas de segunda geração é a sua alta toxicidade para o paciente. Aliado a isso, o longo período de tratamento exigido (no mínimo seis meses) acaba resultando no abandono do mesmo pelo paciente, tendo reflexos importantes no controle da doença e no aparecimento de bacilos ainda mais resistentes (Silva, 1999; Zhang, 2005). Diante do exposto, a profilaxia da doença figura-se como uma intervenção de extrema importância, sendo capaz de diminuir os novos casos de TB em todo o mundo.

II.3.5 Profilaxia da doença: *Mycobacterium bovis* BCG

Albert Calmette e Camille Guérin, trabalhando no Instituto Pasteur de Lille, França, obtiveram uma linhagem virulenta de *M. bovis*, a qual foi isolada de um caso de mastite bovina. A partir daí, durante o período de 1908 a 1921, ou seja, 13 anos, cultivaram esta linhagem em meio contendo bile bovina por 231 sucessivos subcultivos, o que resultou em sua atenuação. Durante este período, vários testes demonstraram que esta linhagem havia perdido sua virulência, mas ainda mantinha suas propriedades imunogênicas. Hoje ela é chamada de Bacilo de Calmette e Guérin ou BCG e é utilizada para prevenção das formas mais graves de TB (Lugosi, 1992, Liu *et al.*, 2009).

Desde 1921, várias linhagens da vacina BCG original foram obtidas e foram, então, denominadas pelo país ou laboratório de origem. Hoje, mais de 50 linhagens, derivadas da BCG original, são conhecidas, mas somente seis estão atualmente em uso como vacina: BCG Connaught, BCG Glaxo, BCG Moreau, BCG Pasteur, BCG Tokyo, BCG Danish (Minnikin *et al.*, 1984; Milstien e Gibson, 1990; Lagranderie *et al.*, 1996).

A primeira vacinação utilizando BCG contra a TB foi realizada em 1921, em Paris. Já no Brasil, os programas de imunização com esta vacina foram iniciados em 1927 (Hijjar *et al.*, 2007). Estima-se, hoje, que cerca de 3,5 bilhões de pessoas já tenham sido vacinadas com a BCG, o que torna esta a vacina a mais amplamente utilizada no mundo (Ernst, 2012).

Embora venha sendo amplamente utilizada no Brasil e em outros países, a eficácia da vacina BCG permanece controversa. Verificou-se que a vacina é capaz de proteger crianças com uma eficácia superior a 80% contra as formas mais severas de TB, incluindo a meningite tuberculosa e a TB miliar (Trunz *et al.*, 2006; Liu *et al.*,

2009). Em contraste, a eficácia da vacina contra a TB pulmonar, em pacientes adolescentes e adultos, varia de 0 a 80%, dependendo da população estudada (Britton e Palendira, 2003; Brewer, 2000; Liu *et al.*, 2009).

Os fatores ambientais, diferenças genotípicas e de idade das populações vacinadas, além das diferenças na virulência nos isolados de *M. tuberculosis* de cada região e a dose vacinal empregada podem explicar as diferentes eficácias da vacina (Brewer, 2000; Smith *et al.*, 2000). Além disso, por meio de análises de genômica comparativa, foi verificado que as diferentes linhagens de BCG utilizadas no mundo possuem composição genética distinta (Behr, 2001). Essa heterogeneidade genética é, provavelmente, causada pelos diferentes mecanismos de atenuação que cada linhagem sofreu em diferentes regiões do mundo (Liu *et al.*, 2009); o que pode contribuir para a variação em sua eficácia protetora (Behr *et al.*, 2001).

Além disso, a perda de muitas regiões do genoma de *M. bovis*, durante o processo de atenuação, também pode ter contribuído para a variação na eficácia da BCG (Cole *et al.*, 1998). Comparado ao genoma de *M. bovis*, tipo selvagem, de 15 a 16 regiões não estão presentes em *M. bovis* BCG (Behr e Small, 1999). Regiões regulatórias podem ter sido perdidas, sendo que a ausência de proteínas regulatórias poderia ocasionar a perda ou expressão inadequada de antígenos imunogênicos e imunoprotetores importantes para gerar uma resposta imune adequada (Mahairas *et al.*, 1996). No entanto, nenhum fator explica, plenamente, a variabilidade na eficácia da BCG.

Além disto, por ser uma vacina viva, a BCG apresenta risco de reversão da patogenicidade, o que limita o seu uso, principalmente, em pacientes imunocomprometidos; casos de infecção devido à vacina BCG tem sido relatados em pacientes HIV positivos e outros indivíduos imuno-comprometidos (Talbot *et al.*, 1997; Doffinger *et al.*, 2000). Estes dados são consistentes com recomendações da WHO e da União internacional Contra Tuberculose e Doenças Pulmonares (*International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, IUATLD), as quais recomendam a descontinuação da vacina BCG em populações com um risco anual de infecção menor que 0,1%, como ocorre nos Estados Unidos da América (EUA) (WHO, 2001; IUATLD, 1994).

Diante desta situação, faz-se necessária a pesquisa e o desenvolvimento de novas vacinas contra a TB, mais seguras, eficazes e sem efeitos colaterais, especialmente para

indivíduos imunocomprometidos. Além disso, a criação de uma nova vacina que possa aumentar a imunidade de indivíduos já vacinados com a BCG, certamente, é uma das intervenções que poderia ter um grande impacto sobre o número de novos casos de TB na população adulta mundial (Dietrich *et al.*, 2006).

II.3.6 Vacinas contra a tuberculose em desenvolvimento

Em 1991, Andersen e colaboradores observaram que o sobrenadante na fase inicial de crescimento da cultura de *M. tuberculosis* apresentava diversos antígenos secretados com grande potencial imunogênico (Andersen *et al.*, 1991). Com isto, a demonstração de que vacinas baseadas em proteínas secretadas poderiam proteger eficazmente contra a TB levou ao início de extensas pesquisas para a descoberta de novos antígenos. Atualmente, diversos destes antígenos já estão sendo testados para o desenvolvimento de novas vacinas contra a TB.

A constatação de que a imunização com micobactérias vivas induz um maior grau de proteção do que com o bacilo morto, teve uma importante influência sobre a busca de antígenos imunologicamente relevantes em *M. tuberculosis*. A justificativa para tanto foi inspirada, em parte, pela constatação de que a imunização com a BCG morta confere pouca ou nenhuma proteção contra a infecção, devido ao fato de que apenas a vacina viva induz a secreção de proteínas no fagossoma, sendo estes os primeiros antígenos a serem apresentados ao sistema imune (Horwitz *et al.*, 1995; Orme *et al.*, 1993).

Assim, nos últimos anos, o grande esforço internacional para o controle da TB resultou na pesquisa e desenvolvimento de diversos candidatos a uma nova vacina contra a TB (Ginsberg, 2002; Orme, 2005; Izzo *et al.*, 2005; Reed e Lobet, 2005). Exemplos de proteínas secretadas por *M. tuberculosis* e que vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de vacinas são as proteínas Ag85B, Ag85A, TB10.4, ESAT-6, Mtb32 e Mtb39, sendo que, frações purificadas de algumas dessas proteínas têm sido utilizadas em ensaios de imunização e têm se mostrado eficazes em gerar uma resposta imune efetiva contra a TB (Olsen *et al.*, 2004; Kamath *et al.*, 2008).

II.4 A família ESAT-6

O sobrenadante da cultura de *M. tuberculosis*, cultivado *in vitro*, foi alvo para a busca de tais antígenos, sobretudo no início da fase de crescimento, devido ao fato destes antígenos serem os primeiros a estabelecerem um contato com o sistema imunológico do hospedeiro (Andersen *et al.*, 1991).

Desta forma, esta busca resultou na descoberta de algumas proteínas, de baixo peso molecular, capazes de induzir respostas imunes com grande eficiência. Dentre estas, a mais imunogênica, denominada de ESAT-6 (*6-kDa Early Secreted Antigenic Target*) é uma proteína de 95 aminoácidos (Sorensen *et al.*, 1995; Berthet *et al.*, 1998) e peso molecular de 10 kDa. Interessantemente, foi verificado que o gene codificador de ESAT-6 estava ausente em todas as linhagens da vacina BCG, mas presente, e ativo, em todas as linhagens virulentas de *M. tuberculosis*; o que levantou a suspeita de que esta proteína teria um papel chave na virulência da bactéria (Gordon *et al.*, 1999; Behr *et al.*, 1999, Pym *et al.*, 2002).

Com a análise da seqüência genômica de *M. tuberculosis*, tornou-se evidente que ESAT-6 foi o primeiro antígeno descrito de uma grande família de proteínas relacionadas, composta por 23 membros, na linhagem de *M. tuberculosis* H37Rv e localizados em 11 loci genômicos diferentes. Seus genes foram geneticamente nomeados de *esxA* até *esxW*, com *esxA* codificando ESAT-6 e *esxB* codificando CFP-10 (*10-kDa culture filtrate protein*) (Brodin *et al.*, 2004; Cole *et al.*, 1998). A família pode ainda ser dividida em subfamílias: a TB10.4, a Mtb9.9, a QILSS, a CFP-10 e a ESAT-6 (Brodin *et al.*, 2004; Skjot *et al.*, 2002; Alderson *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2003; Pym *et al.*, 2003; Renshaw *et al.*, 2002).

Além disto, esta família de proteínas, na qual se encontra ESAT-6, também é definida por um conjunto de características, dentre elas o tamanho da proteína (~100 aa), sua localização *downstream* aos genes PE e PPE, que codificam proteínas ricas em glicina exclusivas de micobactérias (Cole *et al.*, 1998) e a ocorrência de genes cognatos arranjados e transcritos em pares no genoma em uma estrutura *operon-like* (Renshaw *et al.*, 2002).

Estima-se que 52% do proteoma de *M. tuberculosis* H37Rv é resultado de duplicações gênicas (Tekaiia *et al.*, 1999), como no caso dos genes ESAT-6 e CFP-10 que, agrupados a outros genes, parecem ter sido duplicados cinco vezes no genoma de

M. tuberculosis (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). Estes cinco agrupamentos de genes, presentes em *M. tuberculosis* H37Rv, são nomeados de Região 1 (Rv3866-Rv3883c), 2 (Rv3884c-Rv3895c), 3 (Rv0282-Rv0292), 4 (Rv3444c-Rv3450c) e 5 (Rv1782-Rv1798) (Brown *et al.*, 2000; Gey Van Pittius *et al.*, 2001). A presença destes *clusters* gênicos é uma característica de algumas bactérias Gram-positivas de alto conteúdo G + C (Gey Van Pittius *et al.*, 2001).

O genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* e *M. bovis* BCG foram comparados e regiões de diferença (RD) foram identificadas. Uma destas regiões, denominada região de diferença 1 (RD1), compreende nove genes (Rv3871-Rv3879c), sendo que Rv3875 codifica a proteína ESAT-6 e Rv3874 a proteína CFP-10. A análise de RD1 revelou que os genes PE, PPE, ESXA e ESXB estão flanqueados por blocos conservados de genes relacionados ao aparelho secretório da proteína ESAT-6 (Cole *et al.*, 1998; Tekaiia *et al.*, 1999), assim como genes que codificam chaperonas ATP-dependentes associadas à membrana (Rv3869, Rv3870, Rv3871 e Rv3877) (Brown *et al.*, 2000). A chaperona Rv3868 é a responsável pela formação do heterodímero de ESAT-6 e CFP-10 que, deste modo, adotam uma estrutura estável e correta (Renshaw *et al.*, 2002). Estas proteínas fazem parte de um sistema necessário para a secreção do complexo ESAT-6/CFP-10 (Brodin *et al.* 2004; Guinn *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2003; Pym *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2003) que é conhecido como sistema de secreção tipo VII (ESX-1) (Brodin *et al.*, 2004; Ernst, 2012). Neste sistema, apesar da falta de uma sequência sinal convencional de secreção, ambas as proteínas são secretadas (Pym *et al.*, 2003), provavelmente, de forma Sec-independente (Cole *et al.*, 1998).

A genômica comparativa e funcional propiciou inferências valiosas sobre o papel de ESAT-6 na infecção pelo *M. tuberculosis*. A única região genômica que está ausente em todas as linhagens atenuadas de *M. tuberculosis* é a RD1 (Brodin *et al.*, 2002; Mahairas *et al.*, 2004), como em *M. bovis* (BCG) (Tan *et al.*, 2006). Foi verificado que a presença desta região é crucial para a formação do granuloma, através da indução da migração de macrófagos para o sítio de infecção, levando a maior proliferação bacteriana e conseqüentemente o estabelecimento da infecção (Ramakrishnan, 2012).

Assim, diversos trabalhos vêm sendo realizados para um melhor entendimento da função de ESAT-6 na virulência e patogenicidade de *M. tuberculosis*. ESAT-6 possui atividade citolítica, com envolvimento na propagação da doença, facilitando a

disseminação da infecção entre os macrófagos e DCs (Hsu *et al.*, 2003, Gao *et al.*, 2004). Segundo Derrick e Morris (2007), ESAT-6 é capaz de induzir apoptose em macrófagos humanos THP-1 (*Human monocytic leukemia cell line*), possivelmente, através da formação de poros na membrana celular; o que é dependente da dose da proteína e da expressão de genes de caspases. A infecção de células THP-1 com células selvagem de *M. tuberculosis* H37Rv resultou em apoptose; por outro lado, um mutante que não expressava ESAT-6 não induziu a apoptose.

II.4.1 ESAT-6 como um antígeno vacinal

Dada a dimensão global da TB, a vacinação não é apenas uma prioridade, mas continua a ser a única intervenção realista, em termos de saúde pública, capaz de interferir tanto na incidência quanto na prevalência da doença. Neste âmbito, várias metodologias são promissoras para o desenvolvimento de novas vacinas, como o uso vacinas de DNA, utilizando proteínas secretadas ou expostas à superfície celular (Young e Fruth, 1997).

A identificação de ESAT-6 como um antígeno chave para as células T (Andersen *et al.*, 1995; Sorensen *et al.*, 1995) levou a uma investigação mais detalhada do seu papel na imunidade contra a TB. Em cinco de seis linhagens geneticamente diferentes de camundongos, células T específicas para ESAT-6 constituíram de 25 a 35% das células recrutadas na primeira fase da doença (Brandt *et al.*, 1996). Do mesmo modo, na primeira fase da infecção em seres humanos (Ravn *et al.*, 1999), gado (Pollock e Andersen *et al.*, 1997) e porcos da Índia (Elhay *et al.*, 1998), ESAT-6 foi um importante alvo para a resposta de células T. Em um estudo utilizando ELISPOT (*Enzyme-linked immunosorbent spot*), respostas à ESAT-6 foram encontradas em 96% dos pacientes com TB; uma frequência de reconhecimento não encontrada antes com qualquer outro antígeno sozinho (Lalvani *et al.*, 2001b). Além disso, uma forte resposta com anticorpos para ESAT-6 foi encontrada em indivíduos infectados com a TB (Lyashchenko *et al.*, 1998a), em primatas não-humanos (Brusasca *et al.*, 2003) e em bovinos (Lyashchenko *et al.*, 1998b).

Uma característica imunodominante de ESAT-6 é a existência de epítomos para células T que podem ser reconhecidos por diferentes moléculas MHC. Células T murinas reconhecem dois grandes epítomos em ESAT-6, um na região N-terminal (1-20

resíduos, denominado P1) e outro na C-terminal (51-70 resíduos, P6) (Brandt *et al.*, 1996). Em pacientes humanos com TB, muitos epítomos para células T também foram identificados em toda a sequência de ESAT-6 (Ravn *et al.*, 1999; Mustafa *et al.*, 2000; Mustafa *et al.*, 2003).

Por ESAT-6 não estar presente na BCG e em micobactérias atípicas, tem havido grande interesse em utilizar este antígeno como um reagente para discriminar pacientes com TB de indivíduos vacinados com a BCG (Andersen *et al.*, 2000). ESAT-6 tem sido utilizado para desenvolver diagnósticos para a TB, sendo frequentemente reconhecido na infecção inicial, como em testes cutâneos (van Pinxteren *et al.*, 2000; Pollock *et al.*, 2003) e para o diagnóstico das formas latente e ativa da doença (Mori *et al.*, 2004). Além disso, a resposta humoral à ESAT-6 tem sido demonstrada como um diagnóstico potencial a ser utilizado em humanos (Lyashchenko *et al.*, 1998a), gado (Lyashchenko *et al.*, 1998b) e primatas não-humanos (Brusasca *et al.*, 2003) com TB. Porém, é concebível que outros membros da família ESAT-6, assim como as proteínas da família PPE e outros imunogenes restritos a *M. tuberculosis*, também podem ser aplicados para o diagnóstico da TB (Gordon *et al.*, 1999; Okkels *et al.*, 2003). Neste sentido, fica claro que um possível uso futuro de ESAT-6, como um antígeno vacinal contra a TB, não impossibilitaria o diagnóstico da doença.

II.4.2 Vacinas em desenvolvimento utilizando ESAT-6

Diversos estudos para a criação de novas vacinas contra a TB foram realizados utilizando ESAT-6. Foi demonstrado que ESAT-6 pode induzir proteção imunológica como vacina de DNA ou como vacina de subunidade proteica (Kamath *et al.*, 1999, Li *et al.*, 1999; Brandt *et al.*, 2000; Dietrich *et al.*, 2006), induzindo uma resposta imune seja sozinho (Xu *et al.*, 2008a) ou em combinação ou fusão com outros antígenos de *M. tuberculosis*, como o Ag85B (Olsen *et al.*, 2001; Carpenter *et al.*, 2005; Chang-hong *et al.*, 2008; Dissel *et al.*, 2010). Epítomos de ESAT-6 combinados a epítomos de outros antígenos de *M. tuberculosis* também vêm sendo utilizados como vacina de DNA, levando a efeitos protetores equivalentes e, até superiores, a vacinação somente com a BCG (Gao *et al.*, 2009a; Gao *et al.*, 2009b). Além disto, a proteína ESAT-6 vem sendo utilizada como um reforço (*boost*) para a vacina BCG (*prime*) (Dietrich *et al.*, 2007) e

também no desenvolvimento de BCG e outras bactérias recombinantes (Hall *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010).

Vacinas de DNA

A vacina de DNA codificando ESAT-6 e o Flt3 ligante, um fator de crescimento de células dendríticas, induziu uma maior resposta tipo Th1 em camundongos, comparando-se com os controles imunizados com vetor sem ESAT-6 e BCG. Além disto, níveis mais elevados de proliferação de linfócitos e de produção das citocinas IFN- γ e IL-2 por esplenócitos foi observado, bem como o aumento de anticorpos específicos no soro e menores níveis de citocinas IL-4 e IL-10 (Xu *et al.*, 2008a).

A proteína de fusão Ag85B/ESAT6, como vacina de DNA, pode induzir altos níveis de anticorpos específicos IgG2a, em camundongos, levando também à proliferação de linfócitos específicos para Ag85B e ESAT-6, no baço, além da produção de altos níveis de IFN- γ e IL-2, semelhante à resposta provocada pela BCG. Esta vacina de DNA levou a uma significativa proteção contra o desafio com *M. tuberculosis* H37Rv, com redução no número de unidades formadoras de colônia da bactéria no baço e pulmão, enquanto que, no grupo controle, estes órgãos foram seriamente danificados (Chang-hong *et al.*, 2008). Em um trabalho semelhante, a vacina de DNA expressando Ag85A/ESAT-6/HspX de *M. tuberculosis* foi capaz de aumentar a proliferação de células T CD4+ específicas e secreção de IFN- γ e IL-2 comparada à BCG, além de reduzir a replicação do bacilo e inflamação nos pulmões e baço, após o desafio (Yuan *et al.*, 2012).

Em outro trabalho, a imunização intramuscular com três plasmídeos, para a expressão de MPT64, Ag85B e ESAT-6, separadamente, levou a um melhor grau de proteção contra a TB em camundongos desafiados com *M. tuberculosis*, comparando-se aos imunizados com apenas um plasmídeo (Kamath *et al.*, 1999).

Nanopartículas catiônicas também vêm sendo utilizadas para aumentar a eficácia das vacinas de DNA administradas de forma intramuscular. Foi verificado que a vacina de DNA Ag85A-ESAT-6-IL-21, baseada em nanopartículas, mostrou maior eficácia protetora comparada a mesma vacina de DNA sozinha, inibindo o crescimento pulmonar de *M. tuberculosis* em camundongos através do aumento de células produtoras de IFN- γ e anticorpos específicos (Yu *et al.*, 2012).

Vacinas de DNA vêm sendo criadas a partir de subsequências protéicas (epítomos) com padrões de aminoácidos que permitem a ligação às moléculas de MHC humana, resultando em uma vacina de DNA de múltiplos epítomos (ECANS, *Epitopes Casted in a Natural Structure*). Epítomos dos principais antígenos de *M. tuberculosis* (ESAT-6, Ag85A, CFP-10 e Ag85B) foram clonados no domínio intermediário de HSP65 para a imunização de camundongos, resultando em uma resposta imune celular específica com o aumento significativo da proliferação de linfócitos, a secreção de IFN- γ e a atividade de linfócitos T citotóxicos, em relação aos animais que foram vacinadas somente com a BCG (Gao *et al.*, 2009b). Em outros estudos, os mesmos epítomos também levaram a maiores níveis da citocina IL-12 e aumento na relação IgG2a/IgG1 (Gao *et al.*, 2009a).

O regime de vacinação *prime-boost*, utilizando BCG como uma vacina primordial, provavelmente, representa a melhor opção para o desenvolvimento de novas vacinas contra a TB, já que a maioria das pessoas já foram vacinadas com a BCG. Assim, diversos trabalhos vêm apresentando resultados promissores utilizando este regime de vacinação. A combinação da vacina de DNA, codificando ESAT-6, juntamente com a BCG, resultou em uma maior proteção em relação à BCG sozinha; o que levou a uma forte resposta de células T e produção de maiores níveis de IFN- γ , com diminuição de bactérias no pulmão e no baço, além de uma redução da histopatologia pulmonar (Fan *et al.*, 2007). Em outro trabalho, camundongos vacinados primariamente com a BCG subcutânea, seguido da utilização da vacina de DNA expressando a proteína de fusão ESAT-6/Ag85A, como reforço, resultou em um aumento da produção de IFN- γ . Além disto, uma significativa redução de bactérias nos pulmões e baço foi obtida com este regime *prime-boost*, comparada à BCG sozinha (Lu *et al.*, 2011).

Utilizando como vacinas de DNA intramuscular duas construções plasmídicas, uma contendo ESAT-6 e outra Ag85B, ambos os genes fundidos ao gene codificador da β -defensina-2, um indutor da maturação de células dendríticas, foi verificada proteção semelhante à BCG. Além disto, após o regime BCG-*prime* e DNA-*boost*, houve um aumento significativo da sobrevivência e diminuição dos danos pulmonares em relação aos camundongos que receberam apenas a BCG (Cervantes-Villagrana *et al.*, 2013).

Camundongos vacinados em um regime *DNA prime protein boosting*, utilizando ESAT-6 nos dois métodos de vacinação, tiveram a resposta celular e humoral significativamente aumentadas em comparação às formulações vacinais em separado,

além de aumento na produção de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ), aumento na proporção relativa de IgG2a/IgG1 e aumento de células T citotóxicas (Wang *et al.*, 2004).

Além disto, a utilização da vacina de DNA intramuscular (*prime*), contendo epítomos de ESAT-6 e o FL3 ligante, e administração intranasal dos peptídeos de ESAT-6, como *boost*, aumentaram os níveis das citocinas IFN- γ e IL-12, o número de células T produtoras de IFN- γ e aumento de IgG, além gerar proteção contra *M. tuberculosis* após o desafio (Jiang *et al.*, 2013). Essa mesma vacina de DNA foi ainda encapsulada com nanopartículas de quitosana e administrada a camundongos pela via intramuscular (*prime*) e reforçada com o peptídeo ESAT-6/3e intranasal, gerando uma resposta de células T significativa, o que também gerou proteção contra *M. tuberculosis* após o desafio (Feng *et al.*, 2013).

Porém, a via de imunização utilizada para a vacinação com DNA nos trabalhos citados acima são majoritariamente intramuscular (Kamath *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2007; Chang-hong *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008a; Gao *et al.*, 2009a; Gao *et al.*, 2009b; Lu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2012). A via intramuscular, como dito anteriormente, é pouco eficiente em estimular a imunidade de mucosas, importantíssima para a proteção contra a TB, por ser a primeira superfície a entrar em contato com o *M. tuberculosis*. Além disto, as vacinas administradas por via intramuscular que utilizam DNA necessitam de múltiplas doses de grandes quantidades de plasmídeo para a geração de resposta e proteção adequada (Lowrie *et al.*, 1997).

Assim, devido à necessidade do desenvolvimento de vacinas contra a TB que ativem uma resposta imune completa, incluindo a imunidade de mucosas, alguns trabalhos vêm utilizando esta via para administração de vacinas de DNA. A utilização intranasal da vacina de DNA expressando a proteína de fusão Ag85A-ESAT-6-IL-21, como *prime*, e a BCG intranasal, como *boosting*, mostrou resultados promissores de produção de IFN- γ e aumento de sIgA, no lavado bronquíolo-alveolar, além de diminuição da presença bacteriana nos pulmões de camundongos imunizados, comparado à BCG intranasal ou subcutânea (Dou *et al.*, 2012). Porém, a administração de DNA nu, via mucosas, muitas vezes requer grandes doses do plasmídeo (100 μ g no caso anterior), sendo necessária a otimização do processo de entrega através de veículos carreadores e protetores das vacinas de DNA.

Neste contexto, Wang *et al.* (2009) utilizaram uma linhagem patogênica atenuada de *Salmonella typhimurium* como um veículo para a entrega da vacina de DNA codificando a proteína de fusão ESAT6-Ag85B [SL(E6-85B)] pela via oral. Os dados experimentais demonstraram que esta vacina de DNA induziu uma forte resposta imune específica de mucosa, além da humoral e celular sistêmica. Após o desafio de camundongos com *M. tuberculosis* H37Rv, foi verificado que SL(E6-85B) foi tão eficiente quanto a BCG no controle da TB. Porém, SL(E6-85B), combinada com a BCG, foi ainda mais eficaz, pois resultou em um maior controle do crescimento bacteriano, menor inflamação e melhoria global na resposta imune. Contudo, como anteriormente ressaltado, bactérias patogênicas apresentam riscos de reversão, não sendo, assim, totalmente seguras para uso humano, especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (Dunham, 2002).

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo Geral

Utilização da linhagem invasiva *Lactococcus lactis* FnBPA como veículo para a entrega, via mucosas, do plasmídeo vacinal pValac codificando o antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* à camundongos BALB/c e avaliação do perfil imunológico gerado por essa nova formulação vacinal.

III.2 Objetivos Específicos

- Caracterização da linhagem *Lactococcus lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) em cultura de macrófagos e avaliação da produção das citocinas IL-10, IL-12, TNF- α e IL-6.
- Imunização oral de camundongos BALB/c com a linhagem *Lactococcus lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6);
- Avaliação da resposta imune humoral sistêmica através da detecção de IgA, IgG e seus isotipos IgG1 e IgG2a, específicos para ESAT-6, no soro dos animais imunizados;
- Avaliação da resposta imune local de mucosas, através da detecção de sIgA anti-ESAT-6 nas fezes e cólon dos animais imunizados;
- Avaliação da resposta imune celular, através da detecção de IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ no sobrenadante da cultura de esplenócitos estimuladas com rESAT-6.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV. MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos deste trabalho foi dividido nas seguintes seções: i) Considerações iniciais, ii) Construção da linhagem *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6), iii) Clonagem, expressão e purificação da proteína ESAT-6 recombinante, iv) Caracterização das linhagens de *L. lactis* em cultura de macrófagos e v) Ensaio de imunização com as linhagens de *L. lactis* e avaliação da resposta imunológica.

IV.1 Considerações gerais

IV.1.1 Linhagens bacterianas, plasmídeos, condições de cultivo e estocagem

As linhagens bacterianas empregadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1 e os plasmídeos utilizados na Tabela 2 e Figura 7. O meio de cultivo utilizado para o crescimento de *L. lactis* foi o M17 (DifcoTM) + Glicose (0,5%) e, quando necessário, o meio foi suplementado com 5 µg/mL do antibiótico eritromicina (Ery) (Sigma) ou 10 µg/mL do antibiótico clorafenicol (Cm) (Sigma). As linhagens foram crescidas a 30°C, sem agitação. Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico (Difco) foi adicionado aos meios citados. Para fins de estocagem, as linhagens de *L. lactis*, foram cultivadas em meio líquido por um período de 18 horas. Em seguida, as culturas foram diluídas em uma solução estéril de glicerol 80% (1 parte de glicerol 80%:4 partes da cultura bacteriana) e acondicionadas em um ultrafreezer a -80°C.

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani, Accumedia®) e, quando necessário, o meio foi suplementado com 10 µg/mL de Cm [*E. coli*(pValac)] ou 50 µg/mL do antibiótico canamicina (Km) [*E. coli*(pBAD202/D-TOPO®)]. As linhagens foram crescidas a 37°C, sob agitação. Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico (Difco) foi adicionado aos meios citados. Para fins de estocagem, as linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido, por um período de 18 horas, e, em seguida, as culturas foram diluídas em uma solução estéril de glicerol 80% (1 parte de glicerol 80%:1 parte de cultura bacteriana) e acondicionadas em um ultrafreezer a -80°C.

Tabela 1: Linhagens bacterianas

Linhagem	Características	Fonte
<i>Lactococcus lactis</i> Cremoris (MG1363)	Linhagem selvagem	LGCM*
<i>Lactococcus lactis</i> (MG1363) FnBPA	(fnbA / Ery ^r)	Que <i>et al.</i> , 2001
<i>Lactococcus lactis</i> (MG1363) (pValac:ESAT-6)	(ESAT-6 / Cm ^r)	Este trabalho
<i>Lactococcus lactis</i> (MG1363) FnBPA (pValac:ESAT-6)	(ESAT-6 / Cm ^r / fnbA / Ery ^r)	Dissertação Pereira, V. B
<i>Escherichia coli</i> TOP10 pBAD:ESAT-6	(ESAT-6 / Km ^r)	Este trabalho

* Linhagens de *L. lactis* pertencentes ao Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais em colaboração com o grupo do Dr. Philippe Langella do Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (INRA, França).

Tabela 2: Plasmídeos utilizados

Plasmídeo	Características relevantes	Fonte
pBAD202/D-TOPO®	Vetor de expressão: (Km ^r / PBAD / araC gene / pUC ori) ^a	Invitrogen
pBAD:ESAT-6	(Km ^r / PBAD / araC gene / pUC ori / ESAT-6) ^a	Este trabalho
pValac	Vetor de expressão eucariótica: (pCMV / Cm ^r / RepA / RepC) ^b	Guimarães <i>et al.</i> , 2009
pValac:ESAT-6	(pCMV / Cm ^r / RepA / RepC / ESAT-6) ^b	Dissertação Pereira, V. B
pOri23-fnbA	Shuttle vetor: (fnbA / ori ColE1/ P23 / Ery ^r) ^c	Que <i>et al.</i> , 2001

a: pBAD: promotor araBAD; Km^r: resistência à canamicina; pUC ori: origem de replicação; araC gene: codifica uma proteína regulatória do promotor PBAD; ESAT-6: ORF do gene codificador da proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis*.

b: pValac: *Vaccination using Lactic acid bacteria*; pCMV: promotor do citomegalovirus; RepA e RepC: origens de replicação procariótica; Cm^r: gene de resistência ao cloranfenicol; gfp: ORF do gene codificador da proteína verde fluorescente; ESAT-6: ORF do gene codificador da proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis*.

c: Plasmídeo contendo o gene codificador da proteína FnBPA de *Staphylococcus aureus*; Ery^r: resistência a Eritromicina; ori ColE1: origem de replicação; P23: promotor cromossômico de *L. lactis* MG1363.

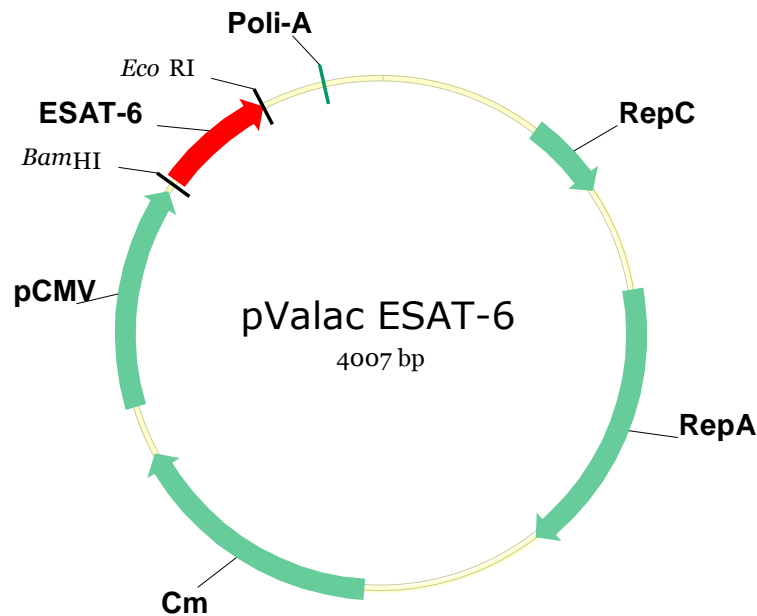


Figura 7: Representação esquemática do vetor de expressão eucariótica pValac (*Vaccination using Lactic acid bacteria*, Guimarães *et al.*, 2009) contendo a ORF ESAT-6 de *M. tuberculosis*. pCMV: promotor do citomegalovírus; MCS: sítio de clonagem múltipla; T7 priming site: para amplificação e/ou sequenciamento do inserto; polyA site: sequência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento; RepA e RepC: origens de replicação procariótica; Cm: gene de resistência ao cloranfenicol; *Bam*HI e *Eco*RI: sítios de restrição utilizados para clonagem da ORF ESAT-6 no vetor pValac.

IV.1.2 Manipulação do DNA

Todos os procedimentos de biologia molecular empregados na manipulação dos DNAs plasmídeos foram realizados de acordo com métodos pré-estabelecidos (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989), com algumas modificações (especificadas junto aos métodos), e/ou segundo a recomendação do fabricante dos kits. As enzimas de modificação e restrição, quando utilizadas, seguiram as recomendações dos fabricantes. As sequências nucleotídicas dos insertos foram confirmadas através de sequenciamento (Sanger *et al.*, 1977).

IV.1.3 Resolução Eletroforética

A qualidade do DNA obtido, incluindo sua concentração e pureza, foi estimada através da resolução eletroforética em gel de agarose. Para isto, ao DNA foi adicionado tampão de amostra 5X e o mesmo foi resolvido em gel de agarose a 1% em tampão

TBE 0,5X, contendo 3,5% de brometo de etídeo (0,5 µg/mL). As resoluções eletroforéticas foram realizadas a 100 V durante, aproximadamente, 1 hora. O DNA foi visualizado em fotodocumentador, onde o gel foi fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta a 320 nm (MultiDoc-It Digital Image -UVP- Benchtop UV Transilluminator). A fotografia (Canon PC1250 7.4v Camera) foi processada pelo programa “Life Science Software from UVP – Image Acquisition Software”. O peso molecular dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de DNA de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (meios e soluções, vide Anexo IV).

IV.2 Construção da linhagem *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6)

A linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (Tabela 1) utilizada neste trabalho foi obtida durante o mestrado (Pereira, V. B. – Dissertação de Mestrado). A linhagem selvagem *L. lactis* (MG1363) contendo o plasmídeo pValac:ESAT-6 foi obtida no presente trabalho.

IV.2.1 Transformação da linhagem selvagem *L. lactis* MG1363 com o plasmídeo pValac:ESAT-6

IV.2.1.1 Confeção de células eletrocompetentes de *L. lactis* MG1363

A preparação de células eletrocompetentes de *L. lactis* MG1363 foi realizada como segue. Um primeiro inóculo foi realizado com 10 µL do estoque de *L. lactis* em 5 mL do meio M17 suplementado com Sacarose (0,5 M) e Glicose (0,5%) (M17-Sac-Gli). Este inóculo foi mantido a 30°C, sem agitação, até a manhã seguinte, totalizando-se 20 horas de crescimento. Um segundo inóculo foi realizado com 100 µL dessa primeira cultura, que foi novamente inoculada em 5 mL do meio M17-Sac-Gli. Este foi incubado a 30°C, sem agitação, por 8 horas. Uma alíquota de 1 µL desta última cultura foi então inoculada em 200 mL de meio M17-Sac-Gli acrescido de 2% de glicina. Uma vez que a cultura alcançou uma densidade óptica, no comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀), em torno de 0,4 - 0,6, esta foi centrifugada a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi então ressuspensão em 200 mL de uma solução gelada e estéril constituída de sacarose 0,5 M e glicerol 10%. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido mais quatro vezes e, após a última

lavagem, o precipitado celular foi ressuspensão em 1 mL de uma solução estéril constituída de PEG3000 30% (*Polyethylene glycol 3000*) e glicerol 10%. Alíquotas de 100 µL dessas células foram estocadas a -80°C até o momento do uso.

IV.2.1.2 Transformação de *L. lactis* MG1363 com o plasmídeo pValac:ESAT-6

O plasmídeo pValac:ESAT-6 foi utilizado para a transformação de *L. lactis* MG1363. Uma alíquota de células eletrocompetentes preparadas no item IV.2.1.1 foram colocadas no gelo por 5 minutos e, logo após, 2 µL do plasmídeo (pValac:ESAT-6 a 150 ng/µL) foi adicionado às mesmas. As células foram mantidas em contato com o DNA plasmideano por 5 minutos no gelo e, logo após, foram colocadas em uma cubeta de 2 mm para eletroporação no aparelho *GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide* (Bio-RAD), nas seguintes condições: 2.400 V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω. Imediatamente após o pulso, 1 mL de M17-Sac-Gli foi adicionado às células e a mistura foi então mantida a 30°C por 3 horas, sem agitação. Como controle negativo, 100 µL de células eletrocompetentes foram transformadas sem adição de qualquer plasmídeo.

A seleção dos transformantes ocorreu em placas M17-Sac-Gli ágar acrescidas de Cm (10 µg/mL) para a seleção de colônias bacterianas contendo o plasmídeo pValac:ESAT-6. As placas foram mantidas a 30°C por aproximadamente 24 horas. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes ao Cm. Na etapa seguinte, três colônias de cada uma das placas foram selecionadas para extração plasmidiana e confirmação da presença da ORF ESAT-6. Os clones selecionados foram cultivados, as culturas foram diluídas (1:4), em glicerol 80%, e acondicionadas a -80°C.

IV.2.1.3 Extração do DNA plasmideano de *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6)

As colônias resultantes da transformação de *L. lactis* MG1363 com o plasmídeo pValac:ESAT-6 foram inoculadas em 5 mL de M17-Sac-Gli suplementado com Cm (10 µg/mL) e a cultura mantida a 30°C por, aproximadamente, 18 horas, sem agitação.

Uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi estocada a -80°C utilizando glicerol 80% na proporção de 1:4 (glicerol:cultura). O restante do inóculo foi transferido para tubos de microcentrífuga e procedeu-se com a extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989) com algumas modificações, como segue: 4 μL de um inóculo, cultivado por, aproximadamente, 18 horas e a 37°C , foram centrifugados por 7 minutos a 13.000 rpm e o precipitado celular coletado e ressuspenso em 250 μL de TE-Lisozima (TE-LYS). A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora. Em seguida, 400 μL da solução de Lise foram acrescentadas à mistura anterior. Após 2 minutos foram adicionados 100 μL de clorofórmio e, logo em seguida, 300 μL da solução de Neutralização. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante (cerca de 500 μL) foi coletado em novos tubos onde foi feita a adição de 2,5 volumes de etanol absoluto, 10% de Acetato de Sódio (3 M) e 1% de Glicogênio (20 mg/mL). Os tubos foram então incubados por, aproximadamente, 30 minutos em freezer a -80°C . Após esse período, foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. Após lavagem com etanol 70% (1 mL), o precipitado foi ressuspenso em 20 μL de água milli-Q estéril. Quando necessário, o DNA foi tratado com 1 μL de RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em Banho Maria a 37°C por uma hora. A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese seguindo os mesmos parâmetros já descritos no item IV.1.3 (meios e soluções, vide Anexo IV).

IV.2.1.4 Confirmação dos clones *L. lactis* MG1363 portadores do plasmídeo pValac:ESAT-6

Com o objetivo de confirmar a obtenção de clones da linhagem de *L. lactis* MG1363 portadores do plasmídeo pValac:ESAT-6, os plasmídeos extraídos no item IV.2.1.3 foram submetidos a uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) descritos na Tabela 3. Foi preparado um mix para a reação de PCR nas seguintes condições: 3 μL de dNTP, 12 μL de MgCl_2 (25 mM; Promega), 30 μL de 5X Colorless Flexi Reaction Buffer (Promega), 0,75 μL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) e 74,25 μL de água milli-Q estéril. As reações foram realizadas em volumes de 10 μL cada, com 8 μL do mix, 0,5 μL de cada *primer* (*Foward* e *Reverse*) e 1 μL de DNA (100 ng). Nenhum DNA foi acrescentado ao controle negativo das reações. As reações ocorreram em um aparelho termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) nas seguintes condições: primeira

desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; anelamento dos *primers* 57°C por 30 segundos; extensão a 72°C durante 2 minutos, extensão final por 5 minutos a 72°C.

Tabela 3: Primers para amplificação de insertos no vetor pValac

<i>Primer</i>	Sequência
<i>forward</i> ValF2	5'-CTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGG-3'
<i>reverse</i> ValR2	5'-GCAACTAGAAGGCACAGTCGAGG -3'
Peso molecular esperado do fragmento amplificado	<i>ESAT-6</i> : 473pb pValac “vazio”: 221 pb

IV.2.2 Curva de crescimento das linhagens de *L. lactis*

Para os experimentos *in vitro* e *in vivo*, foram utilizadas culturas bacterianas cujas células estavam na fase logarítmica (log) de crescimento, devido a sua alta atividade metabólica e viabilidade. Assim, para a verificação do tempo necessário para entrada na fase log de crescimento e para a padronização das unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de cultura, foi realizada uma curva de crescimento das linhagens de *L. lactis* utilizadas neste trabalho. Para isto foram utilizadas as linhagens *L. lactis* MG1363, *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6), *L. lactis* FnBPA e *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6).

Para tanto, no dia anterior à realização da curva de crescimento, um pré-inóculo foi feito a partir da cultura congelada, utilizando os antibióticos adequados (Cm 10 µg/mL e/ou Ery 5 µg/mL). No dia seguinte, foram feitos os inóculos com 1% do pré-inóculo de cada linhagem em duplicata biológica e a DO₆₀₀ foi medida em espectrofotômetro, de hora em hora, durante 10 horas. Nos tempos de 4, 6 e 8 horas, foi feito o plaqueamento de 100 µL da cultura, nas diluições de 10⁻⁴, 10⁻⁶ e 10⁻⁸, para contagem das UFC.

IV.2.3 Ensaio de Viabilidade Bacteriana após sua passagem pelo trato intestinal

Para análise da viabilidade de *L. lactis* e para a verificação de sua característica “transitória” pelo trato intestinal, foi realizado um experimento para verificação de seu tempo de liberação nas fezes dos animais. Para isto, os animais foram imunizados com *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6), *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) e apenas salina (controle negativo), sendo 3 animais por grupo. As fezes foram coletadas após 6, 24 e 48 horas da imunização, maceradas em salina estéril (0,01 g de fezes em 100 µL de salina) e plaqueadas. O plaqueamento foi realizado em placa M17-Gli suplementada com o antibiótico Cm (10 µg/mL) para a seleção e contagem das UFC de *L. lactis* contendo o vetor pValac nas fezes dos animais.

IV.2.4 Ensaio de translocação bacteriana para o fígado

Como primeiro passo para a verificação da segurança da utilização da linhagem invasiva de *L. lactis*, foi realizado um experimento para detecção de bactérias translocadas para o fígado dos animais. Para isto, 5 animais foram imunizados com *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6), *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) e apenas salina (controle negativo). Após 14 dias da imunização, os fígados foram, individualmente, macerados em 1 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e plaqueados, sem diluição, em placa M17-Gli suplementada com o antibiótico Cm (10 µg/mL) para a seleção das bactérias resistentes ao referido antibiótico no fígado dos animais.

IV.3 Clonagem, expressão e purificação da proteína ESAT-6 recombinante

IV.3.1 Amplificação da ORF ESAT-6

A amplificação, por PCR, do fragmento de DNA de 300 pb, contendo a sequência codificadora do gene *ESAT-6*, foi realizada a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* linhagem H37Rv (*Genbank accession number AL123456*). Para isto, dois *primers* foram desenhados de forma complementar à sequência codificadora do gene *ESAT-6*, contendo, ainda, uma sequência para a clonagem direcional no vetor pBAD202/D-TOPO® (Tabela 4).

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 50 μL contendo 5 μL tampão de amplificação *Pfx* 10X (Invitrogen), 1,5 μL de dNTP 10 mM (Invitrogen), 2 μL de MgSO_4 50 mM (Invitrogen), 1 μL do *primer forward* e 1 μL do *primer reverse*, ambos a 100 pMoles/ μL , 0,5 μL do DNA total de *M. tuberculosis* H37Rv (100 ng/ μL), 1 μL da enzima DNA polimerase *Pfx* Platinum® 2,5 u/ μL (Invitrogen) e 39 μL de água milli-Q estéril. A amplificação por PCR foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida por 29 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; anelamento dos *primers* a 63°C por 30 segundos; extensão a 68°C durante 1 minuto; e extensão final por 7 minutos a 68°C. A reação ocorreu em um aparelho termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.). As seqüências dos *primers*, dos sítios de restrição e o peso molecular do fragmento amplificado encontram-se na tabela 4.

Assim, 1 μL da reação de PCR, acima descrita, foi depositado e resolvido em gel de agarose a 1% e a concentração e a pureza do DNA foi então estimada através do marcador de peso molecular Gene Ruler 1Kb (Fermentas) em gel de agarose e leitura em espectrofotômetro.

Tabela 4: Primers utilizados na PCR da ORF ESAT-6.

<i>Primer</i>	Sequência
<i>forward</i> de ESAT-6 (FprotESAT) Sequência para clonagem direcional sublinhada	5' <u>CACCATGACAGAGCAGCAGTGG</u> AATTTC 3'
<i>reverse</i> de ESAT-6 (RprotESAT)	5' AAATGCGAACATCCCAGTGACGTT 3'
Peso molecular esperado do fragmento amplificado	300 pb

IV.3.2 Clonagem da ORF ESAT-6 no vetor de expressão pBAD202/D-TOPO®

O vetor escolhido para a clonagem e a expressão da proteína recombinante ESAT-6 (rESAT-6) foi o vetor comercial pBAD202/D-TOPO® (Invitrogen) (Figura 8). Por possuir a topoisomerase I ligada covalentemente à extremidade 3' fosfato de cada fita de DNA, esta enzima é capaz de fornecer energia à ligação do inserto, facilitando o processo de clonagem. Além disto, este vetor possui, após o forte promotor pBAD, a HP-thioredoxina N-terminal, uma sequência mutada da thioredoxina, transcrita como uma proteína de fusão (adição de 16 KDa na proteína expressa), capaz de aumentar os níveis de tradução da proteína de interesse e aumentar também sua solubilidade celular, facilitando o processo de purificação. A mutação ainda gera histidinas em regiões específicas da proteína dobrada, gerando um domínio de ligação a metais que, juntamente com a cauda de histidina C-terminal, possibilita a purificação da proteína utilizando coluna de níquel, devido à afinidade do aminoácido histidina por cátions bivalentes (íon Ni²⁺).

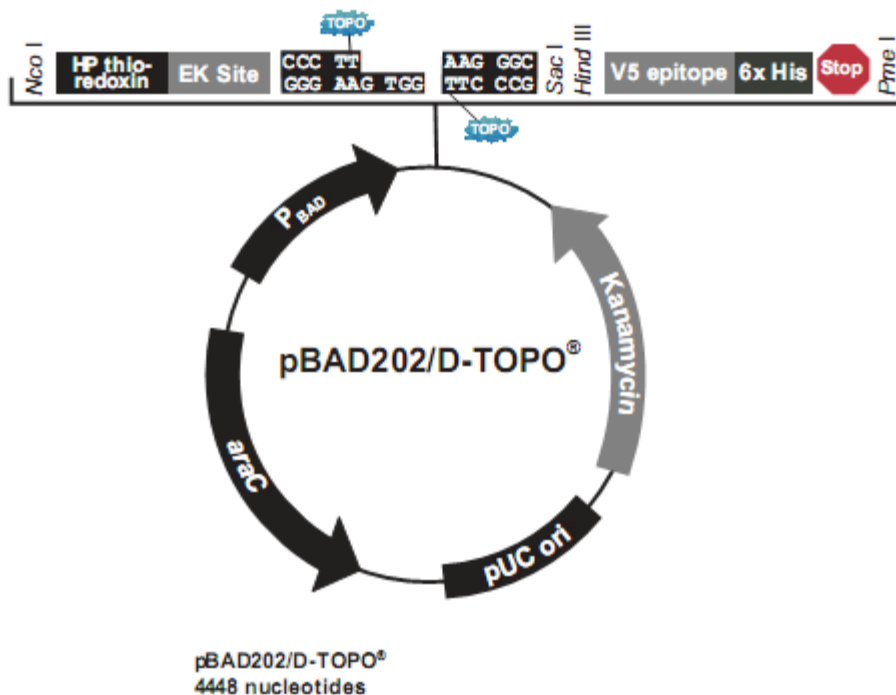


Figura 8: Representação esquemática do vetor pBAD202/D-TOPO®. pBAD: Promotor araBAD; Km^r: gene que confere resistência à canamicina; pUC ori: origem de replicação; araC gene: codifica uma proteína regulatória do promotor pBAD; (Fonte: User Manual pBAD Directional TOPO® Expression Kit , Invitrogen).

IV.3.2.1 Confeção de *Escherichia coli* eletrocompetente

100 µL de uma cultura de *E. coli* TOP10, contendo aproximadamente 10⁸ UFC, foram inoculados em 5 mL de meio LB, sem antibiótico, e incubados a 37°C, durante 18 horas, sob agitação. Em seguida, uma alíquota de 3 mL desta cultura foi inoculada em 300 mL de LB e incubada a 37°C, sob agitação, até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,2 e 0,3. Uma vez alcançada a DO₆₀₀ desejada, a cultura foi resfriada, em gelo, por 30 minutos e redistribuída em seis tubos falcon com 40 mL de cultura, em cada. Posteriormente, cada cultura foi centrifugada a 4.000 rpm durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Para a lavagem do precipitado celular, a cada tubo foram adicionados 40 mL de uma solução, estéril e gelada, de glicerol 10% e as células foram ressuspensas. Os tubos foram, novamente, centrifugados a 4.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado.

Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido mais três vezes e, após a última lavagem, o precipitado celular unificado foi ressuspensão em 1 mL da solução de glicerol 10% e alíquotas de 100 µL foram estocadas a -80°C.

Para análise da eficiência de transformação, uma alíquota (100 µL) com células eletrocompetentes, congelada a -70°C, foi colocada no gelo durante 5 minutos. Em seguida adicionou-se 10 ng do plasmídeo pUC18 ou pUC19 (Amp^r) e a mistura foi incubada por 10 minutos no gelo. Em seguida, a mistura foi transferida para cubetas de eletroporação (2 mm) (BioAgency), previamente resfriadas. As amostras foram submetidas a um pulso de 2.500 V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω utilizando um eletroporador *GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide* (Bio-RAD). Imediatamente após o pulso, adicionou-se às células 1 mL de meio LB e as mesmas foram incubadas a 37°C em Banho Maria, sem agitação, por duas horas. Diluições de 10⁻², 10⁻⁴ e 10⁻⁶ do cultivo bacteriano foram semeadas em meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C durante 18 horas.

IV.3.2.2 Ligação da ORF *ESAT-6* no vetor pBAD202/D-TOPO® e Transformação de *Escherichia coli* TOP10

O amplicon correspondente à ORF *ESAT-6* foi submetido a uma reação de ligação no vetor pBAD202/D-TOPO® (Figura 5) (*pBAD Directional TOPO® Expression Kit, Invitrogen*) para a geração do plasmídeo pBAD:ESAT-6. A ligação foi realizada conforme as instruções do fabricante. O produto de ligação (pBAD202/D-TOPO® e inserto ESAT-6) foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10, preparadas de acordo com o protocolo descrito no item IV.3.2.1.

A transformação foi conduzida por eletroporação. Para tanto, uma alíquota (6 µL) do produto de ligação foi misturada com 100 µL de células eletrocompetentes e incubados no gelo por 20 minutos. A eletroporação foi realizada no aparelho *GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide* (Bio-RAD). Como controle negativo, 100 µL de células eletrocompetentes foram transformadas sem adição de qualquer plasmídeo.

Após a adição de 1 mL de meio LB às bactérias transformadas e incubação a 37°C, o processo de seleção dos transformantes consistiu em semear alíquotas de 100 µL e o restante (precipitado celular de 850 µL), da suspensão de células eletroporadas em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 50 µg/mL de Km. As culturas foram mantidas a 37°C por, aproximadamente, 18 horas. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes à Km. A etapa seguinte

consistiu na seleção de clones de cada uma das placas para proceder com a extração de plasmídeos e confirmar a presença da ORF *ESAT-6* nos mesmos.

IV.3.2.3 Extração do DNA plasmideano de *Escherichia coli* TOP10

Cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo Km 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e mantidas, por cerca de 18 horas, a 37°C, sob agitação. Uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi estocada a -80°C. O restante do inóculo foi transferido para tubos de microcentrífuga e procedeu-se com a extração de plasmídeos com o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), conforme recomendações do fabricante, ou pelo método de lise alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989).

IV.3.2.4 Confirmação da presença e do peso molecular da ORF *ESAT-6* no vetor pBAD202/D-TOPO®.

Para verificar a presença da ORF e o peso molecular do fragmento de DNA clonado no vetor pBAD202/D-TOPO®, o inserto do DNA plasmideano foi amplificado por PCR utilizando uma combinação de *primers*: *primers* para ORF *ESAT-6* FprotESAT e RprotESAT (Tabela 4); *primers* para o vetor pBAD202/D-TOPO® FTrxFus e RpBAD (Tabela 5); e a combinação de FprotESAT e RpBAD, para confirmação da orientação do inserto no vetor.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 μL contendo: 2,5 μL 10X PCR *Buffer* (Invitrogen); 0,75 μL de dNTP 10mM (Invitrogen); 0,3 μL de MgSO_4 50 mM (Invitrogen); 0,5 μL do *primer forward* e 0,5 μL do *primer reverse*, ambos a 100 pMoles/ μL ; 0,5 μL da *miniprep* (100 ng/ μL); 0,5 μL da enzima *Taq DNA Polymerase Recombinant* (5 u/ μL) (Invitrogen); 19,65 μL de água milli-Q estéril. A amplificação por PCR foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos; anelamento dos *primers* a 65°C por 30 segundos; extensão a 72°C durante 1 minuto e 30 segundos e extensão final por 10 minutos a 72°C. A reação ocorreu em um aparelho termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.). Após a reação, 1 μL do produto amplificado foi depositado e resolvido em gel de agarose a 1% sob as mesmas condições descritas no item IV.1.3.

Tabela 5: Primers utilizados para a confirmação da presença da ORF ESAT-6 no vetor pBAD202/D-TOPO®.

<i>Primer</i>	Sequência
<i>forward</i> TrxFus (FTrxFus)	5'-TTCCTCGACGCTAACCTG-3'
<i>reverse</i> pBAD (RpBAD)	5'-GATTTAATCTGTATCAGG-3'
Peso molecular esperado do fragmento amplificado	563 pb

IV.3.2.5 Reação de sequenciamento e análises em sílico

A seqüência nucleotídica da ORF *ESAT-6*, clonada no vetor pBAD202/D-TOPO®, foi confirmada através de sequenciamento utilizando os *primers* FprotESAT e RprotESAT (Tabela 4). Para isto, foi escolhido um clone de *E. coli*(pBAD:ESAT-6), sendo este sequenciado duas vezes *Foward* e duas vezes *Reverse*. Cada amostra foi amplificada utilizando o *kit DYEnamic™ ET Dye Terminator* (GE Healthcare), como se segue: 4,0 µL do *mix ET dye terminator*, 1 µL do *primer* FprotESAT ou RprotESAT (10 pmol/µL) e 5 µL de DNA plasmideano (50 ng/µL). A reação ocorreu em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento do *primer* a 65°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto e 20 segundos.

Logo após, os produtos da reação foram precipitados e lavados, com o objetivo de remover os nucleotídeos marcados não incorporados ao DNA amplificado. Para tanto, a cada amostra foi adicionado 1 µL acetato de amônio 7,5 M (fornecido pelo *kit*) e 30 µL de etanol 96%. A mistura foi homogeneizada e incubada por 20 minutos, à temperatura ambiente, protegida da luz. Seguiu-se, então, com centrifugação (4.000 rpm, durante 45 minutos, a 4°C) e o descarte do sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 100 µL de etanol 70% às amostras e as mesmas foram centrifugadas (4.000 rpm durante 10 minutos), sendo o sobrenadante, novamente descartado. Por fim, as amostras,

precipitadas e secas, foram ressuspensas em 10 μ L de “loading buffer” e armazenadas a 4°C até o momento de sua aplicação no sequenciador MegaBACETM 1000 (GE Healthcare).

As seqüências obtidas foram comparadas utilizando o programa Vector NTI suíte 8 (Invitrogen), onde a integridade da seqüência nucleotídica foi avaliada considerando-se a qualidade do sequenciamento de cada base. As seqüências também foram analisadas utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), utilizando o programa “BLASTn” para a comparação entre seqüências de ácidos nucléicos.

IV.3.3 Indução da expressão da proteína ESAT-6 a partir do vetor pBAD:ESAT-6

Para indução da expressão da proteína ESAT-6 a partir da linhagem *E. coli*(pBAD:ESAT-6), foram testadas cinco concentrações do açúcar indutor arabinose (concentração final de 0,2%, 0,02%, 0,002%, 0,0002% e 0,00002%). Para tal, 1% de um pré-inóculo de 18 horas de cultivo foi inoculado em 10 mL de meio LB (5 tubos) contendo o antibiótico Km (50 μ g/mL). Ao atingir a DO₆₀₀ de 0,5, uma alíquota de 1 mL foi separada como tempo zero (não induzida) e seguiu-se à indução com arabinose. Após 4 horas de indução, o precipitado das culturas induzidas foi armazenado a -20°C para visualização das proteínas em gel e testes de solubilidade. Como controle negativo, foi utilizada a linhagem de *E. coli* TOP10 induzida com arabinose na maior concentração (0,2%).

Os precipitados de 1 mL das culturas, induzidas e não induzidas, foram ressuspensos em tampão de amostra 2X e mantidos a 100°C por 10 minutos e, então, os lisados celulares foram resolvidas em gel de poli-acrilamida sob condições desnaturantes (*Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*: SDS-PAGE). Para isto foi utilizado gel de “separação” na concentração de 15% e o gel de “concentração” a 5%. A eletroforese foi conduzida com voltagem de 50 V para o empilhamento e 160 V para separação das proteínas, em tampão de resolução Tris-glicina. Como marcador de peso molecular, foi utilizado o *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen) (meios e soluções, vide Anexo IV).

Após a coloração dos géis com a Solução de Coomassie Blue por 3 horas, este foi descorado com a Solução descorante por 18 horas, sendo esta trocada de 3 a 5 vezes até o aparecimento das bandas de proteínas coradas. As imagens foram obtidas no aparelho ImageScanner (Amersham Bioscience) utilizando o programa LabScan™ 5.0 (GE Healthcare) (meios e soluções, vide Anexo IV).

IV.3.4 Cinética da expressão da proteína ESAT-6 em *E. coli*(pBAD:ESAT-6)

Para acompanhar a indução da expressão da proteína ESAT-6, foi realizada a cinética da produção da proteína recombinante nos tempos zero (não induzida), 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a indução, utilizando, arabinose a 0,002%. Para isto, seguiu-se à indução, como descrito no item IV.3.3, sendo que, a cada hora, foram coletados 1 mL da cultura induzida para resolução em SDS-PAGE.

IV.3.5 Avaliação da solubilidade da proteína ESAT-6 e padronização da concentração de uréia para purificação

Para a avaliação da solubilidade da proteína ESAT-6 recombinante, a cultura foi induzida, como descrito no item IV.3.3 e o precipitado celular, obtido após 4 horas de indução, foi ressuspensão em 500 µL de PBS 1X, para lise celular, utilizando para isto um sonicador (*Ultrasonic Processor*) na seguinte programação: 3 pulsos de 10 segundos cada a uma amplitude de 20 kHz, no gelo. Após a lise celular, as amostras foram centrifugadas (2 minutos a 13.000 rpm) de forma a separar a fração protéica solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado celular). Estas duas frações foram separadas e resolvidas em SDS-PAGE.

Após o teste de solubilidade, foi realizado um novo teste para verificar qual a concentração de uréia seria capaz de solubilizar a proteína. Para isto, precipitados celulares de 2 mL, induzidos, foram então testados para as seguintes concentrações de uréia: 2 M, 4 M, 6 M e 8 M. Os precipitados celulares foram ressuspensos em PBS 1X contendo a uréia nas concentrações testadas e sonicados na seguinte programação: 3 pulsos de 10 segundos cada a uma amplitude de 20 kHz. Assim, as frações insolúveis (precipitado celular) e solúveis (sobrenadante) foram separadas por centrifugação (2 minutos a 13.000 rpm), sendo então resolvidas em SDS-PAGE.

IV.3.6 Purificação da proteína ESAT-6

Para a purificação da proteína ESAT-6 foi realizado um inóculo de 200 mL, feito a partir de um pré-inóculo, cultivado por 18 horas. Ao atingir uma DO_{600} de 0,5, este foi induzido com a concentração final de 0,002% de arabinose e mantido a 37°C, com agitação, por 4 horas. Em seguida, os 200 mL de cultura foram divididos em 5 tubos (40 mL cada) e centrifugados por 10 minutos a 4.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi, então, descartado e o precipitado celular mantido a -20°C até o dia da purificação. Uma alíquota da cultura induzida foi retirada para fins de confirmação, em SDS-PAGE, da expressão da proteína recombinante ESAT-6.

Para a purificação, o precipitado celular de 40 mL foi ressuspensão em 5 mL de AKTA *wash* (contendo ureia 2M) e sonificado na seguinte programação: 3 pulsos de 10 segundos cada a uma amplitude de 20 kHz. Em seguida, o lisado foi centrifugado por 20 minutos a 4.000 rpm a 4°C, o sobrenadante recuperado em um novo tubo e filtrado (filtro de 0,22 μ m), sendo a amostra mantida no gelo até o momento da cromatografia líquida [FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTAPRIME *plus* - GE Healthcare].

O aparelho FPLC ÄKTAPRIME *plus* foi preparado para a purificação com uma lavagem com água milli-Q, sendo que, em seguida, a coluna de níquel foi posicionada no aparelho (*HisTrap™ HP Columns - Easy, High-performance Purification* - GE Healthcare). Seguiu-se com mais uma lavagem com água milli-Q e mais uma com os tampões AKTA *wash* e AKTA *Elution*. Após a eluição da amostra, acompanhada pelo gráfico gerado com o programa *PrimeView – Prime* (GE Healthcare), as alíquotas foram mantidas a -20°C até sua visualização em SDS-PAGE corado com azul de coomassie (meios e soluções, vide Anexo IV).

Na primeira purificação, todas as alíquotas provenientes da eluição foram resolvidas em SDS-PAGE para confirmação do pico de eluição. Nas purificações seguintes, apenas alíquotas próximas ao pico de eluição foram confirmadas em SDS-PAGE.

IV.3.7 Confirmação do peso molecular e pureza da proteína recombinante ESAT-6 purificada pelo método de Nitrato de Prata

Para a visualização da proteína ESAT-6 recombinante (rESAT-6) e confirmação de sua pureza, esta foi resolvida em SDS-PAGE e este foi submetido à coloração pelo método de nitrato de prata. A coloração iniciou-se com a imersão do gel na Solução de Fixação, por 30 minutos, seguido pela imersão na solução de Sensibilização por mais 30 minutos. Três lavagens foram feitas com água milli-Q, por outros 5 minutos cada. Seguiu-se então com a imersão do mesmo em Solução de Coloração, por 20 minutos, e dois enxágües com água milli-Q por, aproximadamente, 1 minuto cada. Em seguida, o gel ficou submerso na solução de Revelação por 5 minutos. Logo após, o gel foi imerso em solução de Finalização por 10 minutos e mantido em água milli-Q. Todas as etapas foram realizadas sob agitação contínua (meios e soluções, vide Anexo IV).

IV.3.8 Imunodeteccção da proteína recombinante ESAT-6 por *Western Blotting* e ELISA

Para a deteccção da proteína rESAT-6, produzida pela linhagem *E. coli*(pBAD:ESAT-6), o extrato protéico foi resolvido em SDS-PAGE, o qual, em seguida, foi submetido ao método de *Western Blotting*. Para tanto, o gel foi colocado em Tampão de Transferência juntamente com a membrana de PVDF que foi, previamente, embebida em metanol, por 5 minutos, enxaguada em água destilada e mantida, por 15 minutos, em tampão de transferência. A transferência foi realizada no sistema Eletroblotter, semi-seco (Imo), nas seguintes condições: tensão de 5 V e corrente de 300 mA por 1 hora e 10 minutos. A imunodeteccção de rESAT-6 foi realizada utilizando o anticorpo primário policlonal anti-ESAT-6 (*Rabbit polyclonal to ESAT6*, abcam) na concentração final de 0,5 µg/mL e o Kit “*WesternBreeze® Chromogenic Immunodetection*” - *Anti rabbit* (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante.

Posteriormente, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-ESAT-6 (*Mouse monoclonal to ESAT6*; Abcam) para realização de um ensaio imunoenzimático (ELISA; *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de captura, utilizando a proteína rESAT-6 (0,5 µg/poço) para sensibilização da placa. Após 18 horas de incubação, em câmara úmida e a 4°C, a placa foi lavada 2x com Salina-Tween e bloqueada com PBS-caseína. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, a placa foi lavada 2x com Salina-Tween e o

anticorpo monoclonal anti-ESAT-6 comercial (Abcam – 1 mg/mL na diluição 1:3.000) foi adicionado, sendo as placas incubadas por 1 hora a temperatura ambiente.

Após esse período, a placa foi lavada novamente com Salina-Tween (5x) e incubada com o anticorpo anti-mouse IgG - HRP (BD Pharmingen), diluído 1:2.500. Após 1 hora de incubação, a 37°C, a placa foi novamente lavada (5x) e incubada com a solução de revelação. A placa foi incubada ao abrigo da luz até o desenvolvimento da reação. A reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico 2 N e a leitura foi realizada em leitor de ELISA (Expert Plus Microplate Reader) no comprimento de onda de 492 nm (meios e soluções, vide Anexo IV).

IV.3.9 Quantificação da proteína recombinante ESAT-6 pelo método de Bradford

A quantificação da proteína rESAT-6 foi feita pelo método de Bradford (1976). Para isto, foi preparada uma solução de BSA (*Bovine serum albumin*) 1 mg/mL e desta foram feitas as diluições para adição de 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg e 4 µg de BSA em 200 µL da Solução de Bradford, por poço, em uma placa de 96 poços. Para a solução de rESAT-6, foi adicionado 5 µL do estoque purificado em 200 µL da Solução de Bradford e para o branco (negativo) foi adicionado 5 µL de água destilada pura. Todos os itens acima foram feitos em triplicata. A leitura foi feita em leitor de ELISA (*Bio-Rad Model 450 Microplate Reader*) a 595 nm (meios e soluções, vide Anexo IV)

Os valores de absorvância do padrão de BSA foram utilizados para construção de uma curva padrão, sendo possível quantificar a concentração de rESAT-6 previamente obtida.

IV.4 Caracterização das linhagens *L. lactis* em cultura de macrófagos

IV.4.1 Obtenção de células da medula óssea de camundongos C57BL/6

Camundongos C57BL/6 foram eutanasiados por deslocamento cervical e higienizados em etanol 70%, no fluxo laminar. Logo após, a tíbia e o fêmur foram removidos, retirando toda pele e tecido muscular destes membros, suas extremidades foram cortadas para lavagem com 5 mL de HBSS (*Hank's Balanced Solution* – Gibco) 1X gelado, sendo as células medulares recolhidas. Após centrifugação (10 minutos a

4°C), o precipitado celular foi ressuspensão em 1 mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) completo (Gibco). Após a filtração (filtro *Cell stainer*, BD) para retirada das impurezas, as células foram colocadas em placa de petri contendo 10 mL de DMEM completo e mantidas por 4 horas a 37°C, em estufa de CO₂, para a adesão de células já diferenciadas. Assim, as células não aderentes (indiferenciadas) foram lavadas 2X com HBSS e ressuspensas em 1 mL de DMEM completo. Após a contagem das células, as mesmas foram semeadas em uma placa de 24 poços (5 x 10⁵ células por poço) (meios e soluções, vide Anexo IV).

IV.4.2 Diferenciação de células da medula óssea de camundongos em macrófagos

Para estimular a diferenciação das células, anteriormente semeadas, em macrófagos, foi adicionado 10% de LCCM (*L-cell Conditioned Media*), purificado previamente a partir da cultura de células L-929 e gentilmente cedido pelo Professor Sérgio Costa Oliveira (ICB- UFMG). No quarto dia de cultura, foram adicionados mais 100 µL de LCCM e no sétimo dia, o meio DMEM, ainda suplementado com LCCM 10%, foi trocado. Após dez dias de cultura, os macrófagos estavam diferenciados e prontos para cocultura, sendo visualizada a adesão celular em microscópio de luz invertido.

IV.4.3 Cocultura de macrófagos com as diferentes linhagens de *L. lactis*

À cultura de macrófagos, então obtida, foi adicionado 1 x 10⁷ células bacterianas [MOI (*Multiplicity of infection*) de 1 macrófago para 20 bactérias], previamente crescidas e ressuspensas em HBSS. Foram utilizados os seguintes grupos experimentais: DMEM completo (negativo); *L. lactis* MG1363 (controle da linhagem selvagem); *L. lactis* FnBPA (controle da linhagem invasiva); *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6), *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) e LPS (controle positivo). A cocultura ocorreu durante 24 horas, em estufa 37°C + 5% CO₂, e, após este período, o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C até o momento do ELISA.

IV.4.4 Detecção das citocinas IL-10, IL-12, IL-6 e TNF- α após ensaio de cocultura com macrófagos

Para a detecção das citocinas, foi realizado um ELISA do tipo “sanduíche”, utilizando o Kit *BD OptEIA™ Mouse ELISA Set* para IL-10, IL-12 e TNF- α e o kit *Mouse IL-6 DuoSet* (R&D System) para IL-6, conforme recomendações do fabricante. As leituras foram realizadas em um leitor de ELISA automático (*Expert Plus Microplate Reader*) a 492 nm.

Os resultados foram primeiramente analisados pelo programa *online GraphPad QuickCalcs Outlier Calculator* (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>) para exclusão das leituras, estatisticamente, fora da média ($p < 0,05$). A análise de variância foi realizada utilizando o teste paramétrico *One-way ANOVA* [resultados, com distribuição Normal (Gaussiana)], seguido pelos pós-testes "*Bonferroni's Multiple Comparison Test*". Os valores com intervalo de confiança menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados, estatisticamente, significativos. Todas as comparações foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* (*GraphPad Software, San Diego California, USA*). Os resultados estatísticos foram obtidos a partir da análise de três experimentos independentes ($n=12$).

IV.5 Ensaios de imunização com as linhagens de *L. lactis* e avaliação da resposta imunológica

IV.5.1 Animais utilizados para a imunização

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com 4 a 5 semanas de idade e, aproximadamente, 0,0180 Kg, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (Cebio – UFMG).

Primeiramente, o projeto, ao qual este trabalho está associado, foi submetido à Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA/UFMG), sendo este aprovado pelo protocolo 0066 / 2011. Os procedimentos e as manipulações dos animais foram efetuados segundo as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) do ICB/UFMG. Os animais foram mantidos em isoladores específicos, em sala com temperatura, fluxo de ar, ciclo de luz clara/escuro controlada e com livre acesso a água e

ração. As devidas precauções de biossegurança foram tomadas de acordo com normas e regulamentos de biossegurança em nosso departamento.

IV.5.2 Imunização de camundongos BALB/c com as linhagens de *L. lactis*

Para a imunização dos camundongos BALB/c, foram utilizados os seguintes grupos experimentais: Solução fisiológica (controle negativo); *L. lactis* MG1363 (controle da linhagem selvagem); *L. lactis* FnBPA (controle da linhagem invasiva); *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6) e *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6).

As doses vacinais foram preparadas pelo congelamento das culturas bacterianas, em glicerol a 20%, na DO₆₀₀ de 1,0. Para isto, todas as linhagens foram, primeiramente, plaqueadas em meio M17 suplementado com Glicose 0,5% e os respectivos antibióticos. A partir de algumas colônias isoladas, foi feito, então, um pré-inóculo de cada linhagem. No dia seguinte, um novo inóculo foi feito, ajustando-se a DO₆₀₀ para 0,3, a partir do pré-inóculo. Uma vez que a DO₆₀₀ de 1,0 foi alcançada, cada linhagem foi, então, estocada em glicerol 20% e mantida a -80°C, até o momento da imunização.

Para contagem das UFC e verificação da viabilidade das linhagens bacterianas, após o congelamento, uma alíquota de 1 mL de cada dose vacinal foi plaqueada na diluição 10⁻⁶, em duplicata, sendo possível a determinação das UFC/mL, após o congelamento e o ajuste do volume dado a cada animal contendo 10⁸ UFC.

Os camundongos receberam, via oral, e através de uma agulha de gavagem, 1 x 10⁸ UFC de cada linhagem ressuspensa em um volume de 100 µL de solução fisiológica. As imunizações foram realizadas três vezes (dias 1, 15 e 29), sendo que, a cada vez, foram realizados três dias consecutivos de imunização, conforme Figura 9.

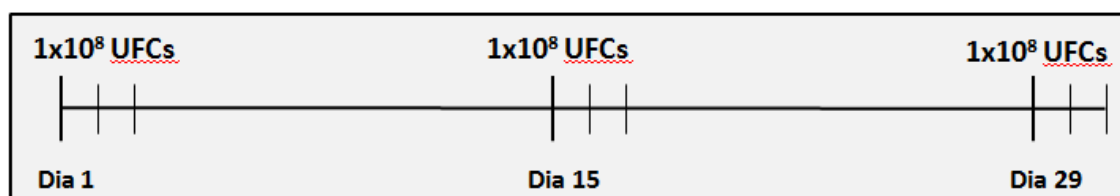


Figura 9: Cronograma de imunização dos camundongos com as linhagens vacinais de *L. lactis*. As imunizações ocorreram durante três dias consecutivos a cada 15 dias (dias 1, 2 e 3; dias 15, 16 e 17; dias 29, 30 e 31), sendo que para cada imunização foi utilizado 1 x 10⁸ UFC.

Como controle positivo sérico, 5 animais foram imunizados, intraperitonealmente, com a proteína rESAT-6 (10 µg/animal) ressuspensa em salina contendo hidróxido de alumínio (1 mg/animal). Após duas semanas, os animais receberam um reforço, apenas com a proteína, pela via intraperitoneal (rESAT-6 10 µg/animal). Passadas mais duas semanas, o soro foi então coletado e estocado a -80°C para utilização nos ELISA de Igs.

IV.5.3 Processamento do soro, fezes e cólon para dosagem de anticorpos

Para a obtenção do soro e a avaliação da resposta imune humoral (IgGs e IgA), a coleta de sangue foi realizada nos dias 14 e 28 dos experimentos de imunização. Após a coleta do sangue dos animais, os tubos foram mantidos a 37°C por, aproximadamente, 1 hora para separação do soro. Em seguida, o coagulado sanguíneo foi centrifugado (10 minutos a 3.000 rpm) e o sobrenadante armazenado no freezer -80°C, até o momento do ELISA.

Nos dias 32, 36 e 42, as fezes de cada animal foram coletadas para uma cinética de dosagem de sIgA. Para isto, para cada 100 mg de fezes coletadas, foi adicionado 1 mL de Solução tampão para extração de tecidos, contendo anti-protease. Esta mistura foi, então, centrifugada por 20 minutos a 2.000 rpm e 4°C para coleta do sobrenadante. O sobrenadante foi utilizado para realização do ELISA.

A eutanásia dos animais foi realizada no dia 42, onde os mesmos foram devidamente anestesiados, utilizando ketamina (60,0 mg/Kg) e xilazina (8,0 mg/Kg), administradas intraperitonealmente. Após a eutanásia, o sangue foi novamente coletado pela artéria aorta abdominal. O cólon também foi coletado e, então, macerado em Solução tampão para extração de tecidos, contendo anti-protease (100 mg do tecido em 1 mL da Solução), para a dosagem de sIgA por ELISA (meios e soluções, vide anexo IV).

IV.5.4 Processamento do baço para cultura de células e dosagem de citocinas

Após a eutanásia dos animais, o baço foi isolado e o seu extrato celular foi obtido utilizando um macerador de vidro autoclavado. O extrato foi, então, centrifugado (10 minutos, 12.000 rpm e 4°C) e o precipitado celular ressuspense em 9 mL de água destilada estéril para a lise das hemácias, seguida de 1 mL de PBS 10x. A mistura foi novamente centrifugada e o precipitado celular ressuspense em 1 mL de RPMI completo (meios e soluções, vide Anexo IV).

As células do baço foram contadas em câmara de Neubauer, sendo que para isto 5 µL da suspensão celular foi diluída em 495 µL de RPMI completo (diluição de 200x). Em seguida, 50 µL desta solução foi diluída em 50 µL de eritrocina (diluição de 2x) para contagem celular em microscópio. Foi utilizado 1×10^6 células do baço por poço em placa de 96 poços.

As culturas foram então estimuladas com 5 µg/mL da proteína rESAT-6, previamente purificada (item IV.3.6). Assim, rESAT-6 foi diluída a uma concentração de 5 µg/mL em RPMI completo, filtrada (filtro de 0,22 µm) e adicionado 100 µL desta solução por poço (0,5µg de rESAT-6 por poço). Uma amostra de cada grupo experimental foi estimulada com Concanalina A (16 µg por poço). Em seguida, o volume de cada poço foi completado para 200 µL com RPMI completo (meios e soluções, vide Anexo IV).

As placas foram mantidas a 37°C, em estufa de CO₂, por 60 horas. Após este período, o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C até o momento da realização dos ELISA.

IV.5.5 Caracterização do Perfil da Resposta Imune Humoral

IV.5.5.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos

A resposta imune de mucosas foi avaliada a partir do extrato das fezes e do macerado do cólon dos animais, pela dosagem da sIgA, específica para rESAT-6. A resposta imune humoral sistêmica foi avaliada a partir do soro, onde foram dosadas IgA, IgG e seus isotipos IgG1 e IgG2a, todas específicas para rESAT-6.

ELISA para IgA e IgGs

Para dosagem de IgA, IgG, IgG1 e IgG2a, específicas para ESAT-6, as placas foram sensibilizadas com a proteína rESAT-6 (0,5 µg/poço). Após 18 horas de incubação, em câmara úmida a 4°C, as placas foram lavadas 2x com Salina-Tween e bloqueada com PBS-caseína. Após 1 hora de incubação, à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas 2x com Salina-Tween e as amostras foram, então, adicionadas aos poços, sem nenhuma diluição. Por fim, as placas, com as amostras de fezes e cólon, foram incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente, e as placas, com as amostras séricas, foram incubadas por 1 hora a 37°C.

Após esse período, as placas foram lavadas com Salina-Tween (5x) e incubadas com o anticorpo anti-mouse IgA (1:8.000) ou IgG (1:2.500), IgG1 (1:1.000) ou IgG2a (1:1.000), conjugados a HRP (BD Pharmingen). Após 1 hora de incubação a 37°C, as placas foram novamente lavadas com Salina-Tween (5x) e, então, incubadas com OPD em tampão citrato e H₂O₂ (solução reveladora). As placas foram mantidas ao abrigo da luz até o desenvolvimento da coloração. A reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico 2 N e a leitura realizada em leitor de ELISA (Expert Plus Microplate Reader) a 492 nm (meios e soluções, vide Anexo IV).

IV.5.6 Caracterização do perfil da resposta imune celular

IV.5.6.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas

Os níveis de IL-4, IL-10, IL-12, TNF-α e IFN-γ foram determinados no sobrenadante da cultura por ELISA. Para tal, foram utilizados anticorpos murinos purificados (BD Pharmingen) anti-citocinas, diluídos em Tampão especial para sensibilização das placas. Após 18 horas de incubação a 4°C com os anticorpos, as placas foram lavadas 2x com Salina-Tween e bloqueadas com PBS-caseína. Após 1 hora de incubação, à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas 2x com Salina-Tween e o sobrenadante da cocultura celular (50 µL) foi adicionado às placas. As citocinas recombinantes, utilizadas como padrão, também foram adicionadas às placas, sendo as mesmas incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Após esse período, as placas foram lavadas com Salina-Tween (6x) e incubadas com os anticorpos biotinizados (BD Pharmingen), específicos para cada citocina testada,

nas seguintes concentrações: IL-4 (6 µL/mL), IL-10 (8 µL/mL), IL-12 (2 µL/mL), TNF- α (8 µL/mL) e IFN- γ (3 µL/mL). Após 1 hora de incubação, à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas com Salina-Tween (6x) e incubadas com Estreptavidina-HRP (BD Pharmigen) diluída 1:15.000 em PBS-caseína, durante 45 minutos, à temperatura ambiente.

Finalmente, após 6 lavagens com Salina-Tween, a revelação foi feita através da incubação de uma solução de OPD e H₂O₂ como substrato (Solução reveladora), em Tampão citrato. As placas foram incubadas ao abrigo da luz até o desenvolvimento da coloração. A reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico 2 N e a leitura realizada em leitor de ELISA automático (Expert Plus Microplate Reader) a 492 nm (meios e soluções, vide Anexo IV).

IV.5.7 Detecção de células TCD4+ e TCD8+ produtoras de IFN- γ através de citometria de Fluxo

A marcação intracelular de IFN- γ em células TCD4+ e TCD8+ foi realizada utilizando a cultura de esplenócitos estimulados, ou não, com rESAT-6. Para isto, 1 x 10⁶ células foram plaqueadas conforme item IV.5.4 e, após 12 horas de cultura celular em estufa 37° e 5% CO₂, estas foram transferidas para placa de Facs e mantidas durante 2 horas em RPMI e Brefeldin A (10 µg/mL- Sigma). Após este período, as células foram lavadas 2x com PBS-wash (centrifugação 1.200 rpm por 10 minutos) e, então, adicionado os anticorpos marcadores de superfície [anti-mouse CD8-Fitc 0,5 mg/mL (1:200) e anti-mouse CD4-PE CY5 0,2 mg/mL (1:300) - BD PharmagenTM]. Após a incubação a 4°C por 30 minutos, ao abrigo da luz, as células foram lavadas 2x, ressuspensas em Tampão de Fixação (Mouse Foxp3 Buffer set - BD PharmagenTM) e mantidas a 4°C por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com Solução de Permeabilização (Mouse Foxp3 Buffer set - BD PharmagenTM) e incubadas nesta solução por mais 30 minutos a 4°C. Após uma lavagem, as células foram incubadas com o anticorpo anti-mouse IFN- γ -PE [2 mg/mL diluição (1:50)- BD PharmagenTM] por 20 minutos e à temperatura ambiente. Após duas lavagens, estas foram fixadas em Macs-Facs para a análise por citometria de fluxo (FACScan) (meios e soluções, vide Anexo IV).

IV.5.8 Análises estatísticas

Os resultados foram primeiramente analisados pelo programa online *GraphPad QuickCalcs Outlier Calculator* (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>) para exclusão das leituras, estatisticamente, fora da média ($p < 0,05$). A análise de variância foi realizada utilizando o teste paramétrico *One-way ANOVA* [resultados, com distribuição Normal (Gaussiana)], seguido pelos pós-testes "*Bonferroni's Multiple Comparison Test*" ou "*Dunnett's Multiple Comparison Test*". Os valores com intervalo de confiança menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados, estatisticamente, significativos. Todas as comparações foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego California, USA).

Os resultados estatísticos obtidos para a resposta imune celular e de mucosas (sIgA) foram obtidos a partir da análise de dois experimentos independentes ($n=10$), onde cada animal foi avaliado individualmente. Para a resposta imune humoral sérica (IgG, IgG1 e IgG2a) foram analisados quatro experimentos independentes ($n=20$). Nos tempos 1 e 2 (duas semanas após a primeira imunização e duas semanas após segunda imunização, respectivamente), o volume de sangue obtido dos camundongos, vivos, não permitiu que cada animal fosse avaliado independentemente. Assim, os resultados foram obtidos a partir de um *pool* sérico em duplicata. Já a resposta imune humoral sérica do tempo 3 (dia da eutanásia) foi avaliada normalmente (cada animal individualmente).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 Construção da linhagem *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6)

Para prosseguir com os experimentos *in vitro* e *in vivo*, além da linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (Tabela 1), obtida durante o trabalho de dissertação de mestrado (Pereira, V. B., 2011), foi necessário a obtenção de uma outra linhagem bacteriana “controle” para fins de comparação do perfil imunológico gerado após a cocultura com macrófagos ou imunização dos camundongos. Assim, a linhagem selvagem (MG1363), a mesma que deu origem à linhagem recombinante invasiva (FnBPA), foi transformada com o vetor pValac:ESAT-6, resultando na linhagem *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6).

Após a transformação, seguiu-se com a seleção das colônias recombinantes, sendo que após 24 horas de cultivo, um número incontável de colônias foi obtido. Destas, três colônias foram, então, selecionadas, de forma aleatória, para dar prosseguimento à confirmação da presença do plasmídeo pValac:ESAT-6 em suas células; o que se deu através de extração plasmidiana seguida de PCR utilizando *primers* específicos do plasmídeo pValac (Tabela 3) para a amplificação da ORF ESAT-6.

Como resultado, foi possível observar que os plasmídeos, provenientes das células derivadas das três colônias selecionadas, propiciaram a amplificação de um produto de peso molecular de, aproximadamente, 473 pb; o que corresponde ao peso molecular esperado para a ORF ESAT-6, acrescida de uma pequena porção nucleotídica do plasmídeo pValac (Figura 10).

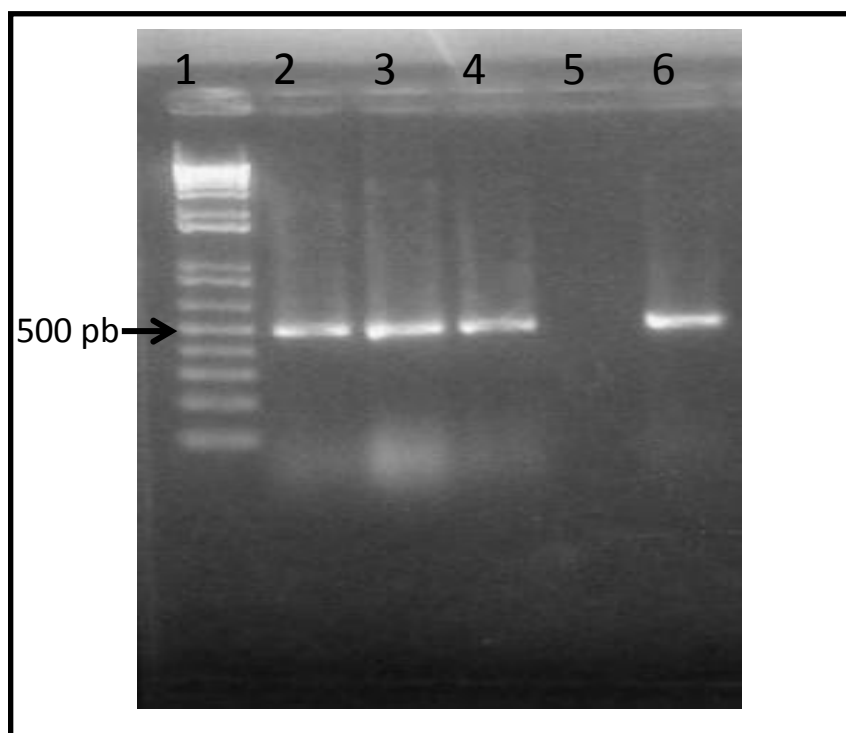


Figura 10: Confirmação da ORF ESAT-6 em *L. lactis* MG1363. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Amplificação da ORF ESAT-6. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2, 3 e 4: Confirmação de três clones *L. lactis* MG1363 pValac:ESAT-6, por amplificação da ORF ESAT-6 (473 pb); Canaleta 5: Controle negativo; Canaleta 6: Controle positivo com o plasmídeo pValac:ESAT-6. A seta indica o marcador de peso molecular de 500 pb.

V.1.1 Estabelecimento das doses vacinais a serem utilizadas nos experimentos *in vitro* e *in vivo*

De posse de todas as linhagens bacterianas [*L. lactis* MG1363; *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6); *L. lactis* FnBPA e *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6)] (Tabela 1), a serem utilizadas nos experimentos *in vivo* e *in vitro*, fez-se, então, necessário estabelecer a dose vacinal a ser utilizada nestes experimentos.

Sendo assim, realizou-se a caracterização do crescimento das referidas linhagens, através de uma curva de crescimento, a fim de se estabelecer em qual momento do cultivo das linhagens a dose vacinal, preconizada, em UFC, seria alcançada. A caracterização do crescimento de *L. lactis* foi realizada pela medição da DO₆₀₀, seguida do plaqueamento das bactérias para a contagem das UFC, finalizando com a construção da curva de crescimento bacteriana.

De posse dos dados, pode-se observar que a fase logarítmica do crescimento das linhagens ocorreu entre a 3^a e a 7^a hora de cultivo (Figura 11). Além disso, uma vez feita a correlação entre a DO₆₀₀ alcançada pelas linhagens e a contagem, em placa, das UFC das mesmas, pôde-se determinar um valor de $6,6 \times 10^8$ UFC/mL para as linhagens *L. lactis* FnBPA e para *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), $1,1 \times 10^9$ para a linhagens *L. lactis* MG1363 e $1,3 \times 10^9$ para *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6) (Figura 12). Todas as contagens citadas foram após 6 horas de crescimento e a partir de uma cultura com 1% de inóculo fresco.

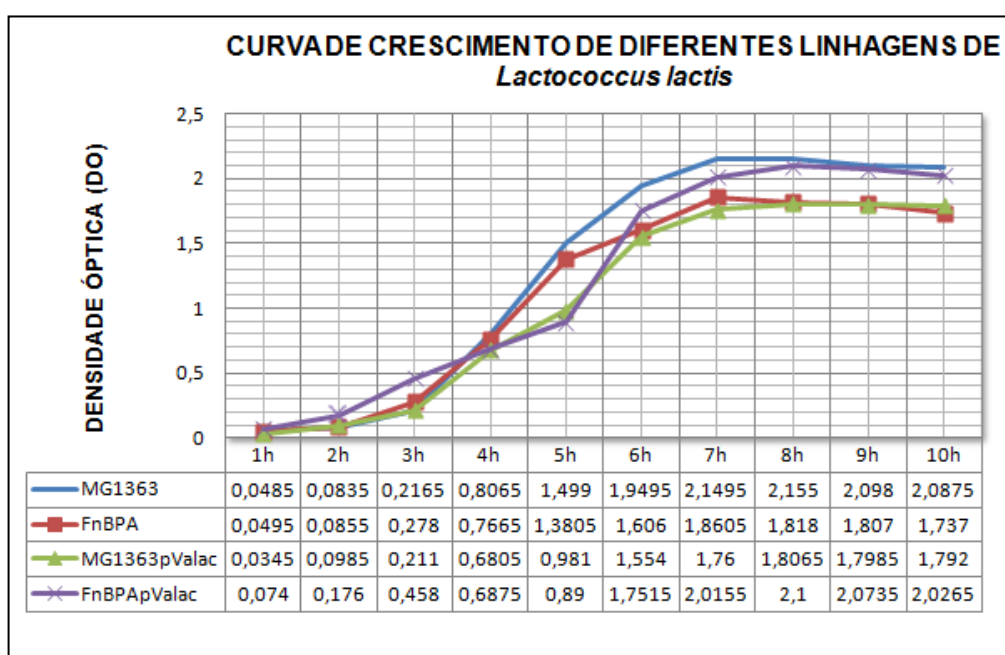


Figura 11: Curva de crescimento de diferentes linhagens de *Lactococcus lactis* pela medida de densidade óptica (DO₆₀₀). Valores de DO₆₀₀, obtidos, de hora em hora, durante 10 horas de crescimento de cada cultura bacteriana, onde MG1363: *L. lactis* MG1363; FnBPA: *L. lactis* FnBPA; MG1363pValac: *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6) e FnBPApValac: *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). Leituras de DO específicas de cada linhagem abaixo dos tempos analisados.

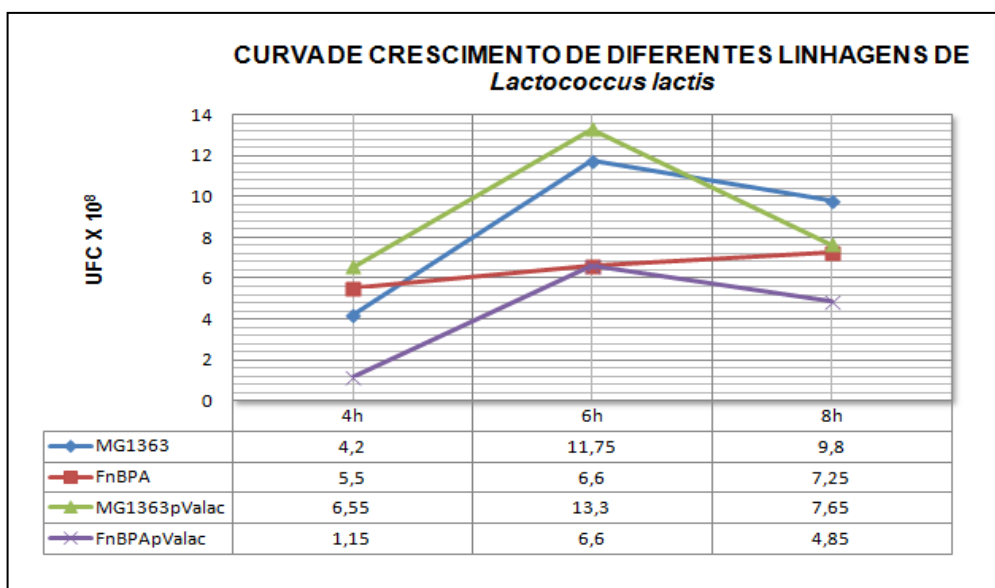


Figura 12: Curva de crescimento de diferentes linhagens de *Lactococcus lactis* pela contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Contagem de UFC a partir do plaqueamento de 100 μ L da diluição 10^{-6} da cada cultura, onde MG1363: *L. lactis* MG1363; FnBPA: *L. lactis* FnBPA; MG1363pValac: *L. lactis* MG1363 pValac:ESAT-6 e FnBPApValac: *L. lactis* FnBPA pValac:ESAT-6. Dados expressos em UFC/mL; contagens específicas de cada linhagem abaixo dos tempos analisados.

V.1.2 Ensaio de viabilidade bacteriana na passagem pelo trato intestinal

Para a avaliação do tempo de passagem da bactéria *L. lactis*, naturalmente transitória, pelo trato gastrointestinal, foi realizado um experimento para contagem das UFC liberadas por grama de fezes, após a imunização oral dos camundongos. Para isto, os animais foram imunizados com *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6) ou *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) ou apenas salina (controle negativo). Com o plaqueamento do extrato fecal, foi observado, após 6 horas da gavagem, a presença de 1×10^5 UFC/g de fezes da linhagem *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6) e 1×10^4 UFC/g de fezes da linhagem *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), não sendo detectado nenhum crescimento no grupo salina. Já após 24 horas da gavagem, nenhuma UFC foi detectada para ambas as linhagens, confirmando a característica transiente de *L. lactis* pelo trato intestinal. Pode-se inferir que a menor detecção (5x menos) da linhagem invasiva, em relação à linhagem não invasiva, possa ser devido apenas à menor viabilidade da mesma, pois se acredita que apenas cerca de 1% das bactérias administradas irão, realmente, ser internalizadas pelas células intestinais.

V.1.3 Ensaio de Translocação bacteriana para o fígado

Com o objetivo de se verificar a segurança da utilização da linhagem invasiva de *L. lactis* FnBPA, foi realizado um experimento para detecção, ou não, da bactéria translocada para o tecido hepático dos animais após a imunização oral. A translocação bacteriana consiste na migração de bactérias ou produtos bacterianos (endotoxinas) pela mucosa intestinal, atingindo locais extraintestinais, como os gânglios linfáticos mesentéricos. Em seguida, estas bactérias e os seus produtos podem, a partir do linfonodo mesentérico, atingir a circulação sistêmica, se disseminando para outros tecidos e órgãos, como o fígado e o baço (Wong *et al.*, 2005).

A possibilidade de translocação foi levantada devido a presença da proteína recombinante FnBPA na superfície celular de *L. lactis* FnBPA, que a torna uma bactéria invasiva; o que poderia, de alguma forma, alterar seu status GRAS e sua utilização de forma segura *in vivo*. Assim, após o plaqueamento do macerado hepático dos animais que receberam, orogastricamente (por gavagem), a linhagem *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), não foi observado crescimento bacteriano, indicando a ausência de translocação para o tecido hepático dos animais analisados; o que representa um primeiro indício da segurança da utilização de *L. lactis* recombinante, contendo o gene da FnBPA de *S. aureus*. Nenhum crescimento foi detectado também para *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6) e salina.

O gene da FnBPA expresso, constitutivamente, em *L. lactis* tem apenas a função de adesão às células epiteliais intestinais pela bactéria, promovendo sua internalização, onde a bactéria é lisada, entregando o plasmídeo vacinal às células eucariotas. Assim, a condição invasiva, muito provavelmente, não altera a segurança da utilização oral de *L. lactis*.

V.2 Clonagem, expressão e purificação da proteína ESAT-6 recombinante

Para iniciar os experimentos de imunização oral dos camungongos com as referidas linhagens de *L. lactis*, ainda foi necessário a obtenção da proteína ESAT-6 recombinante (rESAT-6) purificada, para o estímulo da cultura de esplenócitos e a sensibilização das placas de ELISA. Além disto, a obtenção da proteína purificada também foi necessária para a obtenção de um soro positivo para a padronização da

detecção de Igs anti-ESAT-6 nos animais imunizados. Assim, seguem os resultados dos experimentos de clonagem, indução da expressão e purificação da proteína rESAT-6.

V.2.1 Clonagem da ORF ESAT-6 no vetor de expressão pBAD202/D-TOPO®

Para tanto, e como um primeiro passo rumo à obtenção da rESAT-6, a seqüência codificadora do gene ESAT-6 (300 pb) foi amplificada, por PCR, a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* linhagem H37Rv (*Genbank accession number* AL123456), utilizando *primers* específicos (Tabela 4) para a clonagem, direcional, no vetor pBAD202/D-TOPO® (Figura 13A).

Em seguida, o amplicon, correspondente à ORF ESAT-6, foi submetido a uma reação de ligação, junto ao vetor pBAD202/D-TOPO®, para a geração do plasmídeo pBAD:ESAT-6. Após a transformação de *E. coli* TOP10, eletrocompetentes, com o produto da ligação, foram obtidas várias colônias resistentes ao antibiótico Km. Destas, cinco foram escolhidas, de forma aleatória, para a verificação da presença do plasmídeo pBAD:ESAT-6. Essa confirmação também se deu através de PCR utilizando *primers* específicos (Tabela 4). Como resultado, pôde-se confirmar a presença da ORF ESAT-6 nos cinco clones testados, pois, todos os produtos de amplificação, apresentaram um produto de, aproximadamente, 300 pb, como o esperado para a ORF ESAT-6 (Figura 13B).

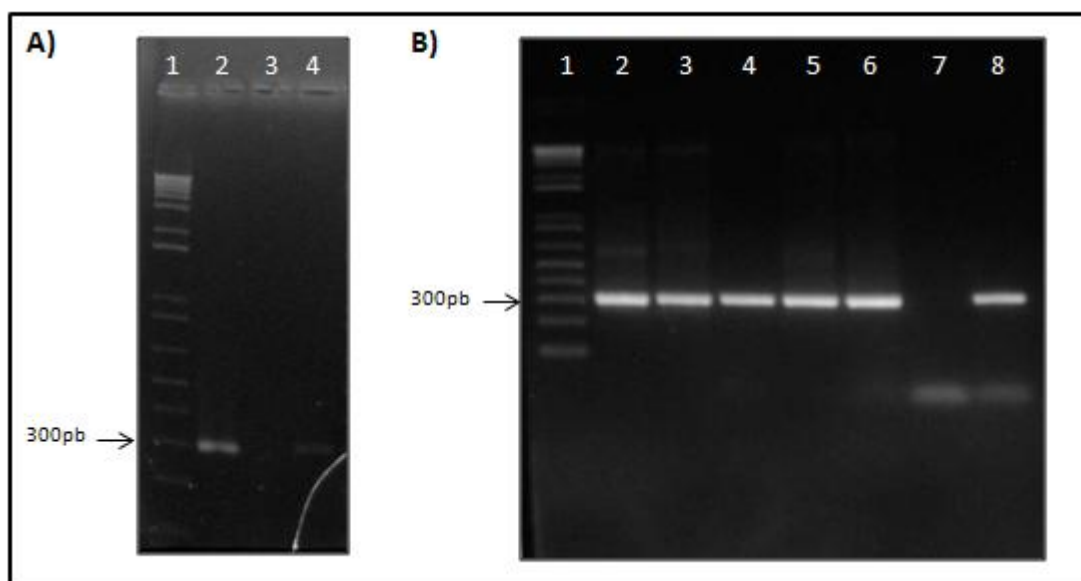


Figura 13: Amplificação e clonagem da ORF ESAT-6 no vetor pBAD202/D-TOPO®. A) Amplificação da ORF ESAT-6 a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis*: Canaleta 1- Marcador 1Kb Plus; Canaleta 2- Amplificação da ORF ESAT-6 com os *primers* protESAT-6 (300pb); Canaleta 3- Controle negativo da PCR; Canaleta 4- Controle positivo da PCR. B) Confirmação por PCR da presença da ORF ESAT-6 em cinco possíveis clones de *E. coli* pBAD:ESAT-6. Canaleta 1- Marcador 1Kb Plus; Canaleta 2, 3, 4, 5 e 6- Amplificação da ORF ESAT-6 com os *primers* protESAT-6 (300pb); Canaleta 7- Controle negativo da PCR; Canaleta 8- Controle positivo da PCR. As setas indicam o marcador de peso molecular de 300 pb.

Com a confirmação da presença da ORF ESAT-6 nos clones anteriormente selecionados, um destes (clone 1) foi escolhido para a confirmação, não só da presença da ORF ESAT-6 no vetor pBAD202/D-TOPO®, mas também confirmar a orientação do inserto no mesmo. Assim, também por PCR, mas utilizando *primers* específicos para o vetor (Tabela 5), deu-se a confirmação como segue. Com os *primers* FTrxFus e RpBAD, pôde-se observar uma amplificação de, aproximadamente, 531 pb, correspondente à ORF ESAT-6 e parte do vetor (Canaleta 3). Já com a combinação dos *primers* FprotESAT e RpBAD, pôde-se observar uma amplificação de aproximadamente 463 pb (Canaleta 4), a qual confirma a orientação, correta, do inserto no vetor.

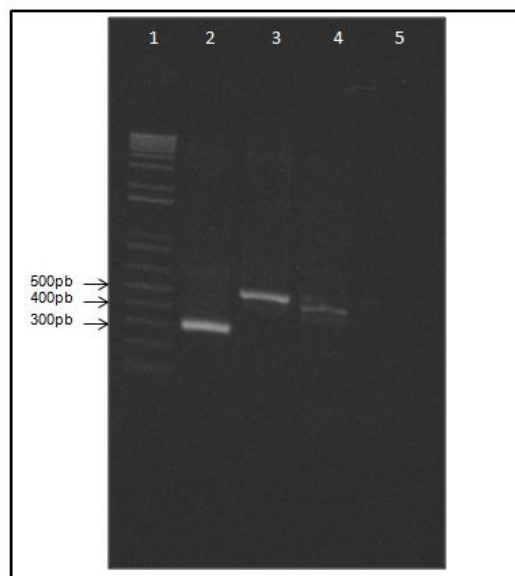


Figura 14: Confirmação da clonagem e orientação da ORF ESAT-6 no vetor pBAD202/D-TOPO®. Canaleta 1- Marcador 1Kb Plus; Canaleta 2- Amplificação da ORF ESAT-6 com os *primers* protESAT-6 *Foward e Reverse* (300pb); Canaleta 3- Amplificação da ORF ESAT-6 e parte do vetor pBAD com os *primers* FTrxFus e RpBAD (531 pb); Canaleta 4- Amplificação da ORF ESAT-6 e parte do vetor posterior à ORF, utilizando os *primers* FprotESAT e RpBAD (463 pb); Canaleta 5- Controle negativo da PCR. As setas indicam os marcadores de peso molecular de 300, 400 e 500 pb, respectivamente.

Por fim, confirmada a clonagem e a orientação da ORF ESAT-6 no vetor pBAD202/D-TOPO®, o clone 1 foi, então, submetido a uma reação de sequenciamento, utilizando os *primers* protESAT-6 (Tabela 4), onde pôde-se confirmar tanto a integridade nucleotídica da respectiva ORF quanto parte da sequência nucleotídica plasmidiana (Dados não demonstrados).

V.2.2 Indução da expressão da proteína rESAT-6 a partir do vetor pBAD:ESAT-6

Com a construção do plasmídeo pBAD:ESAT-6, partiu-se, então, para a indução da expressão da rESAT-6 e sua purificação. A indução da expressão da rESAT-6 se deu a partir do clone 1 [*E. coli* TOP10(pBAD:ESAT-6)] e foi realizada utilizando cinco concentrações do açúcar indutor, arabinose (item IV.3.3).

A partir de uma concentração de 0,0002% deste indutor, já foi possível visualizar, em SDS-PAGE corado com azul de coomassie, a expressão da rESAT-6, com, aproximadamente, 26 kDa (Figura 15). Porém, com uma concentração de 0,002%

de arabinose (Figura 15; Canaleta 7), pode-se observar um maior nível de expressão de rESAT-6; o que, visualmente, em nada diferiu das concentrações mais elevadas de arabinose. Assim, esta última foi a concentração escolhida para ser utilizada nos demais experimentos.

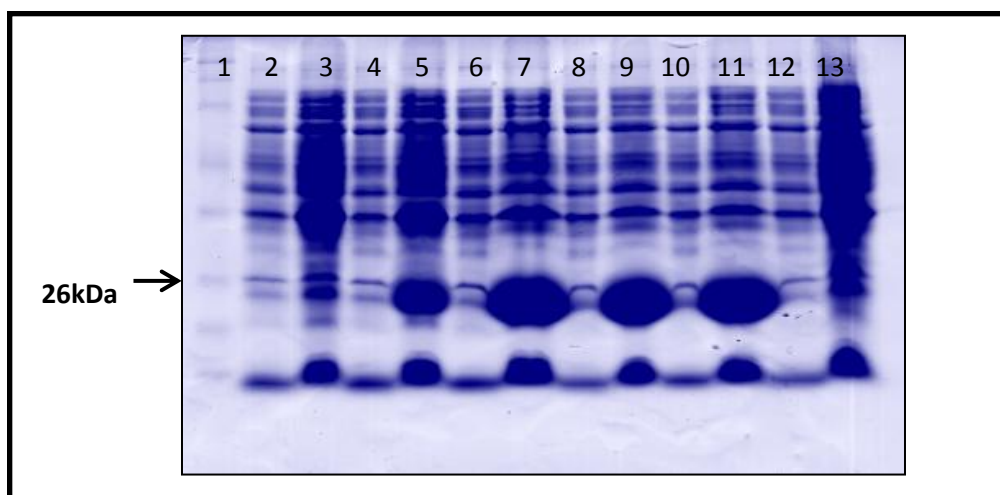


Figura 15: SDS-PAGE da indução da expressão da proteína recombinante ESAT-6 a partir da linhagem *E. coli* pBAD:ESAT-6. SDS-PAGE da fração protéica total bacteriana induzida com arabinose. Canaleta 1: Marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Não induzido (tempo zero); Canaleta 3: Indução de 4 horas a 0,00002% de arabinose; Canaleta 4: Não induzido (tempo zero); Canaleta 5: Indução de 4 horas a 0,0002% de arabinose; Canaleta 6: Não induzido (tempo zero); Canaleta 7: Indução de 4 horas a 0,002% de arabinose; Canaleta 8: Não induzido (tempo zero); Canaleta 9: Indução de 4 horas a 0,02% de arabinose; Canaleta 10: Não induzido (tempo zero); Canaleta 11: Indução de 4 horas a 0,2% de arabinose; Canaleta 12: Controle negativo não induzido (tempo zero); Canaleta 13: Controle negativo (*E. coli* TOP10 pura induzida 4 horas a 0,2% de arabinose). A seta indica o peso molecular de 26 kDa.

Após a padronização da concentração de arabinose para a indução da expressão da rESAT-6, também foi realizada uma avaliação da cinética da expressão da proteína recombinante nos tempos zero (não induzida) e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas, após a indução com a concentração ótima de arabinose, estabelecida anteriormente (0,002%). Assim, foi observado que, 4 horas após a adição do indutor, a expressão da proteína atinge o seu máximo e se estabiliza, haja vista que, visualmente, a espreçura da banda referente à rESAT-6, em nada difere da espreçura das bandas com 5 e 6 horas de expressão (Figura 16). Sendo assim, o tempo de 4 horas de indução foi, então, escolhido para a obtenção da rESAT-6 purificada.

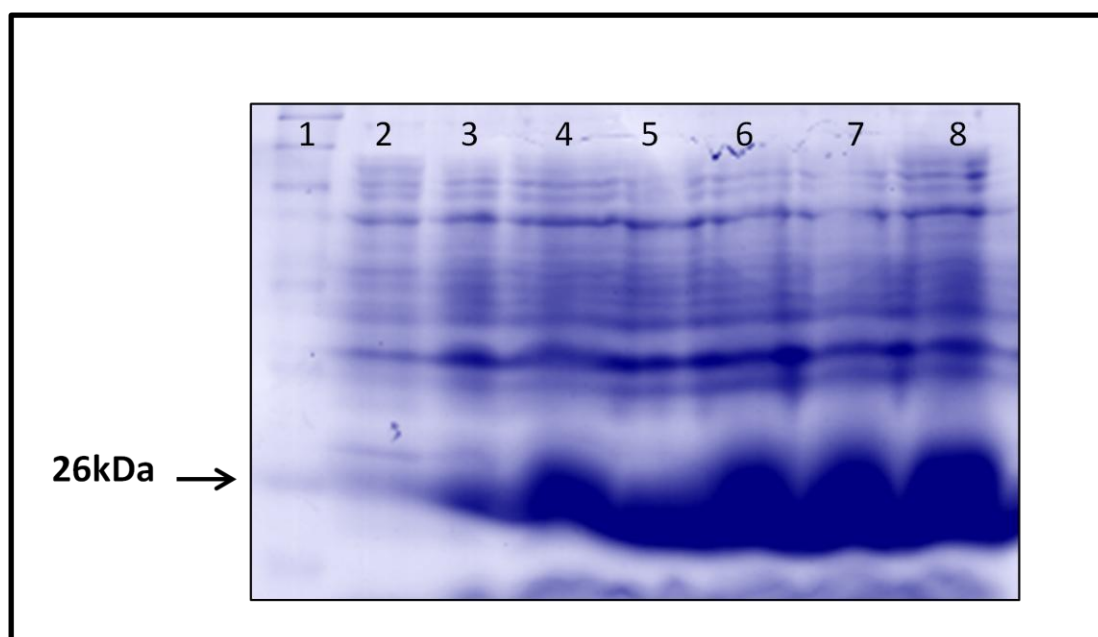


Figura 16: Cinética da expressão da proteína recombinante ESAT-6. Indução com arabinose à 0,002%. Canaleta 1: Marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Tempo zero (não induzido); Canaleta 3: Indução de 1 hora; Canaleta 4: Indução de 2 horas; Canaleta 5: Indução de 3 horas; Canaleta 6: Indução de 4 horas; Canaleta 7: Indução de 5 horas e Canaleta 8: Indução de 6 horas. A seta indica o peso molecular de 26 kDa.

V.2.3 Avaliação da solubilidade da proteína rESAT-6 e padronização da concentração de uréia para purificação

Para a avaliação da solubilidade da rESAT-6, a cultura bacteriana foi induzida (arabinose a 0,002% por 4 horas), o precipitado celular foi lisado, a fração solúvel do sobrenadante foi separada da fração insolúvel do produto lisado e, por fim, a amostra foi resolvida em SDS-PAGE.

A rESAT-6 foi observada apenas na fração celular insolúvel de *E. coli* TOP10(pBAD:ESAT-6) (Figura 17; Canaleta 4). Apesar da presença, N-terminal, da proteína de fusão Thioredoxina no vetor pBAD202/D-TOPO®, que, em teoria, pode aumentar a solubilidade da proteína de interesse, não foi possível a obtenção da rESAT-6 na fração celular solúvel. Com isso, fez-se necessária a solubilização, com uréia, da rESAT-6 contida na fração celular insolúvel.

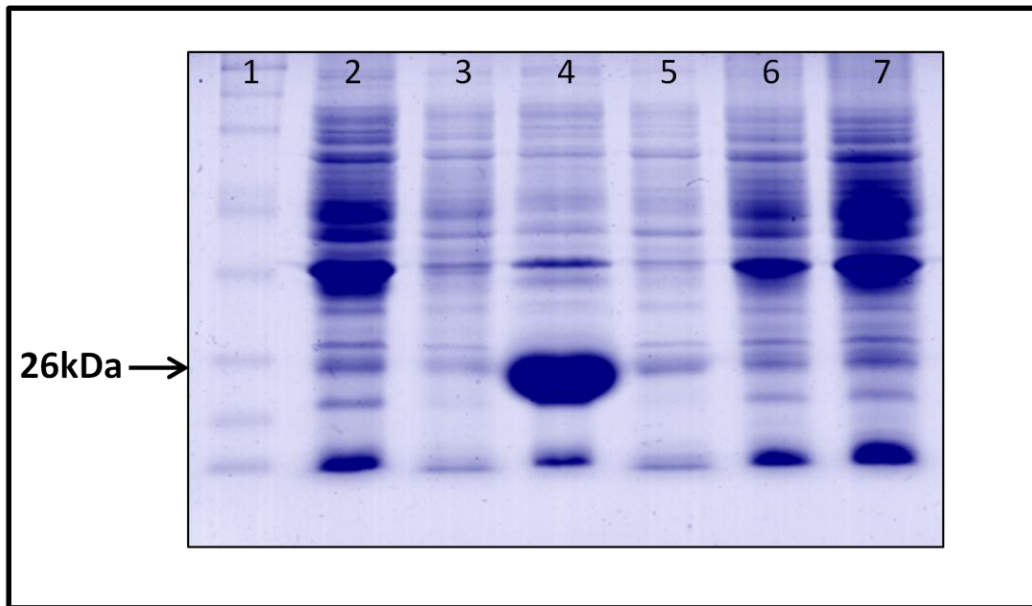


Figura 17: Avaliação da solubilidade da proteína rESAT-6. Canaleta 1: Marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Fração insolúvel do extrato protéico de *E. coli* TOP10(pBAD:ESAT-6) induzida com 0,00002% de arabinose; Canaleta 3: Fração solúvel do extrato protéico de *E. coli* TOP10(pBAD:ESAT-6) induzida com 0,00002% de arabinose; Canaleta 4: Fração insolúvel do extrato protéico de *E. coli* TOP10(pBAD:ESAT-6) induzida com 0,002% de arabinose; Canaleta 5: Fração solúvel do extrato protéico de *E. coli* TOP10(pBAD:ESAT-6) induzida com 0,002% de arabinose; Canaleta 6: Fração insolúvel do extrato protéico de *E. coli* TOP10 induzida com 0,2% de arabinose (controle negativo); e Canaleta 7: Fração solúvel do extrato protéico de *E. coli* TOP10 induzida com 0,2% de arabinose (controle negativo). A seta indica o peso molecular de 26 kDa.

Para tanto, foi realizado um novo teste para verificar qual a concentração de uréia seria capaz de solubilizar a proteína. Assim, foram testadas diferentes concentrações de uréia (2 M, 4 M, 6 M e 8 M). Porém, em todas as concentrações testadas, obteve-se apenas a solubilização parcial da proteína recombinante, sem diferença visível na quantidade de proteína na fração celular solúvel (Figura 18). Desta forma, a concentração de 2 M foi a escolhida para a solubilização da proteína, já que uma menor concentração de uréia é desejável para facilitar a desalinização da proteína já purificada.

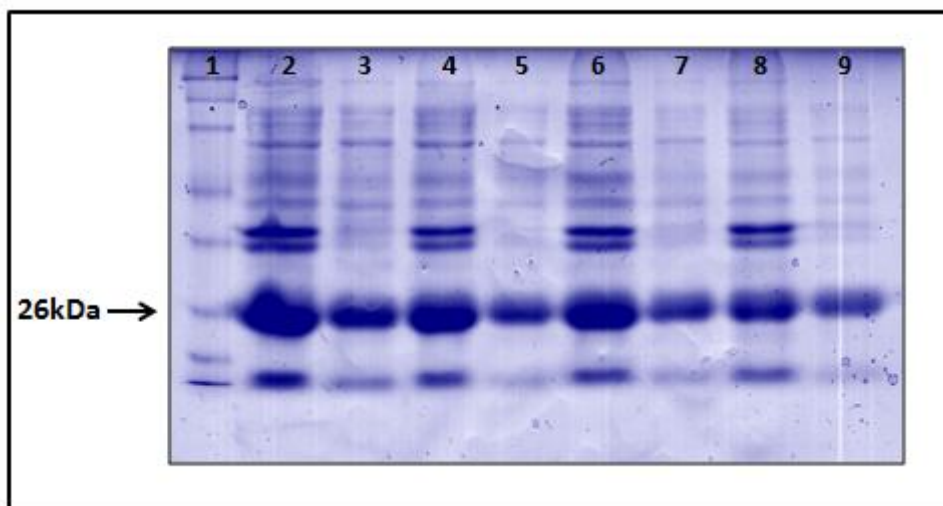


Figura 18: Teste de solubilização, com diferentes concentrações de ureia, da proteína rESAT-6. Canaleta 1: Marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Fração protéica insolúvel, após a adição de uréia a 2 M; Canaleta 3: Fração protéica solúvel, após a adição de uréia a 2 M; Canaleta 4: Fração protéica insolúvel, após a adição de uréia a 4 M; Canaleta 5: Fração protéica solúvel, após a adição de uréia a 4 M; Canaleta 6: Fração protéica insolúvel, após a adição de uréia a 6 M; Canaleta 7: Fração protéica solúvel, após a adição de uréia a 6 M; Canaleta 8: Fração protéica insolúvel, após a adição de uréia a 8 M; Canaleta 9: Fração protéica solúvel, após a adição de uréia a 8 M. A seta indica o peso molecular de 26 kDa.

V.2.4 Purificação da proteína ESAT-6 em FPLC

Estabelecidos os parâmetros de concentração do indutor, tempo de expressão e concentração de uréia para a solubilização da rESAT-6, seguiu-se, então, com a purificação da mesma, utilizando o equipamento FPLC ÄKTAPRIME plus (GE Healthcare) e coluna de níquel com afinidade para cauda de histidina.

Durante a eluição das proteínas, foi possível verificar uma pequena elevação da curva do gráfico (pico), indicando a eluição da proteína recombinante da coluna de níquel. Por fim, todos os eluatos foram resolvidos em SDS-PAGE, sendo verificada a presença da rESAT-6 nas amostras 12 e 13, em maior concentração (Figura 19; Canaleta 2 e 3).

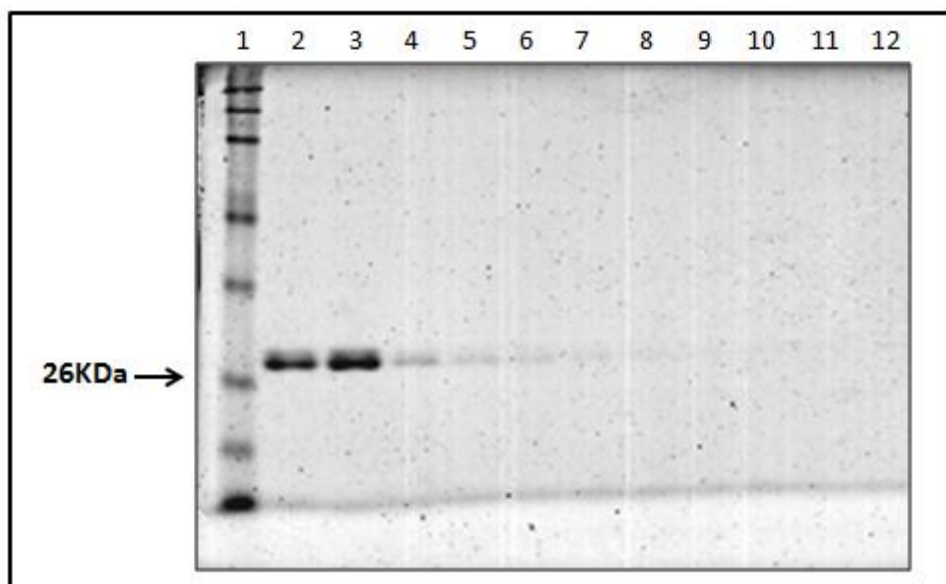


Figura 19: Purificação da proteína rESAT-6 em FPLC. Canaleta 1: Marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen); Canaletas 2 a 12: Amostras dos eluatos 12 a 22 da purificação, evidenciando a proteína rESAT-6, em maior concentração, nas amostras 12 e 13. A seta indica o peso molecular de 26 kDa.

Com a purificação da rESAT-6, sua pureza e imunogenicidade foi testada tanto por resolução eletroforética, em SDS-PAGE corado com nitrato de prata, quanto por *Western Blotting* e ELISA, respectivamente.

A pureza da proteína recombinante foi confirmada, haja vista que, após a sua resolução eletroforética, em SDS-PAGE corado com nitrato de prata, não foi visualizada nenhuma banda além da correspondente à rESAT-6 (Figura 20A). Já através das técnicas de *Western Blotting* e ELISA, utilizando o anticorpo policlonal ou monoclonal anti-ESAT-6, foi possível visualizar a imunodeteção da proteína recombinante purificada (Figura 20B; Canaleta 2). Contudo, provavelmente devido à utilização do anticorpo anti-ESAT-6 policlonal, também foram verificadas no *Western Blotting* imunodeteções inespecíficas de diversas proteínas no extrato protéico celular de *E. coli* TOP10(pBAD:ESAT-6), utilizada, aqui, como um controle positivo do experimento (Figura 20B; Canaleta 3).

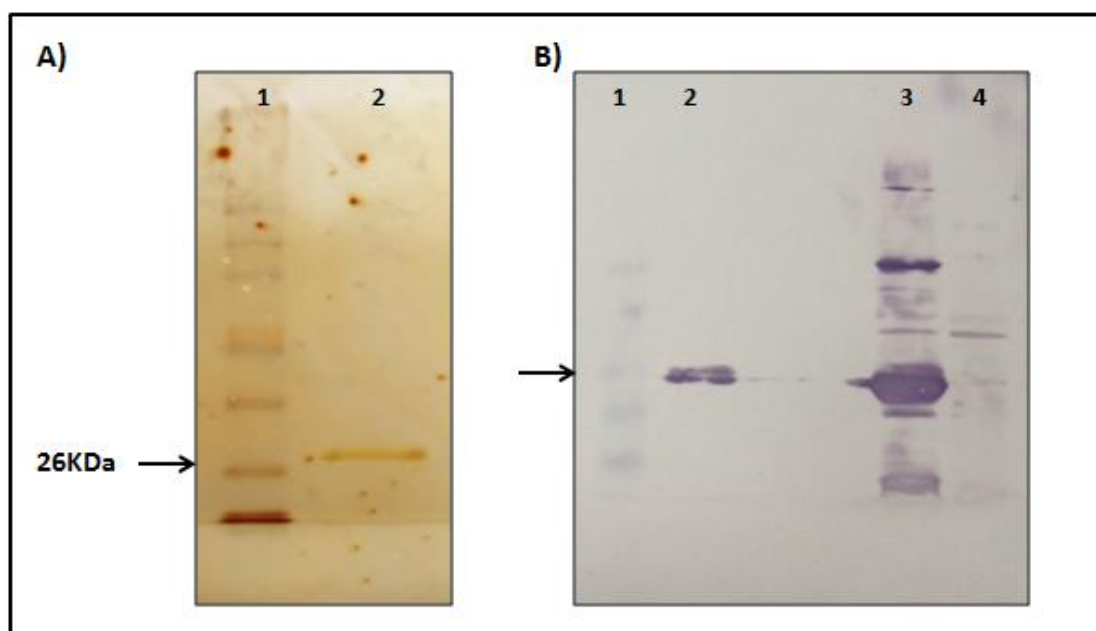


Figura 20: Confirmação da pureza e imunodetecção da proteína rESAT-6. A) Coloração com nitrato de prata da rESAT-6 purificada. Canaleta 1: Marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen) e Canaleta 2: rESAT-6 purificada. B) *Western Blotting* da rESAT-6 purificada. Canaleta 1: Marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: rESAT-6 purificada; Canaleta 3: Extrato protéico de *E. coli* TOP10(pBAD:ESAT-6) induzido (controle positivo); e Canaleta 4: Extrato protéico de *E. coli* TOP10 induzido (controle negativo). As setas indicam o peso molecular de 26 kDa.

Por fim, a concentração da rESAT-6, obtida com a purificação, foi, então, estimada pelo método de Bradford. Assim, pôde-se determinar que a proteína recombinante purificada estava na concentração de 377,36 µg/mL. Ao longo deste trabalho, outros 4 experimentos de purificação foram realizados, gerando um total de 3,396 mg de rESAT-6.

V.3 Caracterização do perfil imunológico gerado pelas linhagens de *L. lactis* em cultura de macrófagos

Com o intuito de caracterizar, preliminarmente, o perfil imunológico gerado pelas linhagens de *L. lactis*, utilizadas neste trabalho, as mesmas foram cultivadas com macrófagos e um *pool* específico de citocinas foi detectado e analisado. Para isto, foram utilizados os seguintes grupos experimentais: DMEM completo (negativo); *L. lactis* MG1363 (controle da linhagem selvagem); *L. lactis* FnBPA (controle da linhagem

invasiva); *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6), *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) e LPS (controle positivo).

Após 24 horas do cocultivo das linhagens de *L. lactis* com macrófagos em cultura, a produção das seguintes citocinas foi mensurada: IL-10, TNF- α , IL-12 e IL-6; utilizando, para tanto, ELISA.

A citocina IL-10 foi detectada no sobrenadante da cocultura de macrófagos com as diferentes linhagens de *L. lactis*, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais testados.

A citocina IL-6 também foi detectada no sobrenadante da cocultura de macrófagos com as diferentes linhagens de *L. lactis*, sendo que, para as linhagens não invasivas [*L. lactis* MG1363 e *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6)], houve um aumento, estatisticamente significativo, em relação às linhagens invasivas [*L. lactis* FnBPA e *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6)] (Figura 21). Além disto, para as quatro linhagens testadas, houve um aumento, estatisticamente significativo, em relação ao grupo que recebeu apenas o meio de cultivo DMEM completo (controle negativo).

Para a citocina IL-12, foi detectado um aumento, estatisticamente significativo, apenas no sobrenadante da cocultura de macrófagos com as linhagens não invasivas, *L. lactis* MG1363 e *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6). Para as linhagens invasivas, *L. lactis* FnBPA e *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), não houve diferença em relação ao grupo que recebeu apenas o meio de cultivo DMEM completo (controle negativo) (Figura 21).

Por fim, a citocina TNF- α foi detectada em maior quantidade, e estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, apenas no sobrenadante da cocultura de macrófagos com as linhagens *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6) e *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). Porém, não houve diferença entre estas e as linhagens controle *L. lactis* MG1363 e *L. lactis* FnBPA (Figura 21).

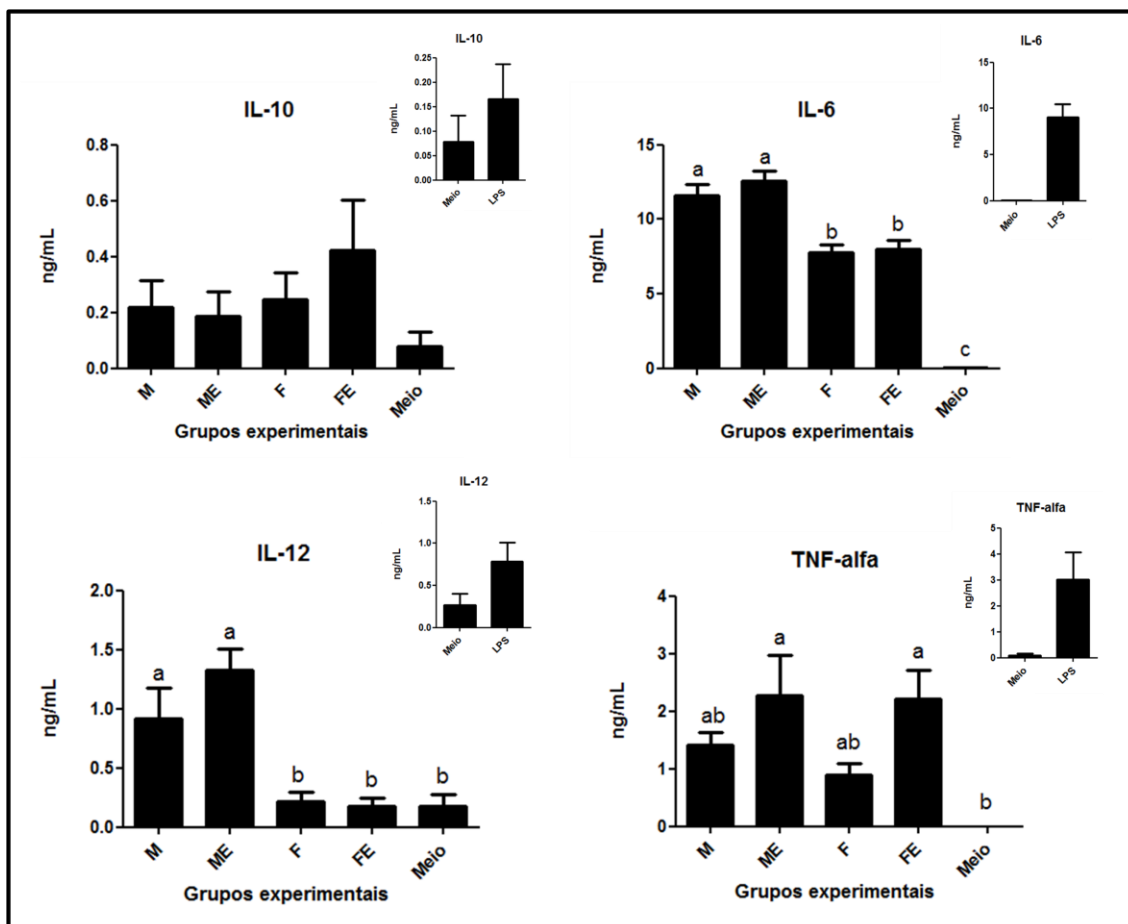


Figura 21: Produção de IL-10, IL-6, IL-12 e TNF- α por macrófagos em cocultura com as linhagens de *L. lactis*. Resultados representados como a média \pm SEM de dois experimentos independentes para IL-12 (n=8) ou três experimentos independentes para IL-10, TNF- α e IL-6 (n=12). Grupos experimentais: Meio: DMEM completo (negativo); M: *L. lactis* MG1363; ME: *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6); F: *L. lactis* FnBPA; FE: *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). Lipopolissacarídeo (LPS) foi utilizado como controle positivo da cultura. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$, sendo “a,b,c” estatisticamente diferentes entre si.

Aparentemente, os resultados indicam que a presença, ou não, do vetor pValac:ESAT-6 nas linhagens utilizadas para o cocultivo, não foi capaz de alterar os resultados obtidos para a produção das citocinas IL-10, IL-6 e IL-12 por macrófagos. Apenas para a produção de TNF- α foi possível verificar um aumento, estatisticamente significativo, para os grupos *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6) e *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), porém estes não diferiram das linhagens desprovidas do vetor (*L. lactis* MG1363 e *L. lactis* FnBPA). Sendo assim, não foi possível confirmar o aumento de TNF- α relacionado à presença do vetor pValac:ESAT-6.

Em parte, estes resultados eram esperados, já que um pequeno período de cocultivo (24 horas), entre os macrófagos e as respectivas linhagens de *L. lactis*, provavelmente, não resultou na expressão da ORF ESAT-6 em níveis capazes de alterar a resposta imune inata dos macrófagos ao antígeno. Além disto, deve-se levar em consideração que a MOI utilizada (de 20 bactéria para 1 macrófago) favoreceu a rápida resposta inata dos macrófagos às bactérias.

Em um trabalho semelhante, DCs derivadas da medula óssea de camundongos foram cocultivadas com as linhagens invasivas, ou não, de *L. lactis*, carreando, ou não, pValac:BLG. Como resultado, foi verificado um aumento da secreção de IL-12 para ambas as linhagens (invasiva ou não), expressando, ou não, a BLG. Assim, a expressão da BLG pelas DCs também não influenciou o perfil imune estimulado, como verificado em macrófagos diferenciados. Porém, diferentemente do trabalho aqui apresentado, o *status* invasivo também não afetou a expressão de IL-12 em DCs. A citocina IL-10 também foi verificada por ELISA, porém esta não foi detectada para nenhuma das linhagens testadas em cocultivo com DCs (De Azevedo, comunicação pessoal).

Por fim, com os resultados *in vitro* aqui obtidos, foi verificado que todas as linhagens, invasivas ou não, foram capazes de estimular a produção de TNF- α e IL-6 em macrófagos, sendo as linhagens não invasivas capazes, também, de estimular a produção de IL-12. Porém, não foi possível inferir o perfil gerado pela formulação vacinal (pValac:ESAT-6) em relação à resposta ao antígeno ESAT-6. Além disto, a detecção da citocina IFN- γ , citocina esta não produzida por macrófagos, é de extrema importância para a avaliação desta resposta, sendo ESAT-6 capaz de gerar uma resposta imune celular do tipo Th1.

Deste modo, os experimentos *in vivo* são de extrema importância para a continuidade do projeto, para a análise do perfil imune específico gerado em resposta ao antígeno e, além disto, para a validação do método de entrega utilizando *L. lactis* como carreador de vacinas gênicas orais.

V.4 Avaliação do perfil imunológico após a imunização de camundongos BALB/c com as linhagens de *L. lactis*

Considerando que não foi possível acessar, preliminarmente, o perfil de resposta imunológica gerado pela formulação vacinal *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6) ou *L.*

lactis FnBPA(pValac:ESAT-6), após o cocultivo com macrófagos, seguiu-se, então, com os experimentos de imunização dos camundongos.

Pela via oral, foram administradas doses de 10^8 UFC, de cada linhagem bacteriana [*L. lactis* MG1363 (linhagem selvagem), *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6), *L. lactis* FnBPA (linhagem invasiva) e *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6)], além do controle negativo que recebeu apenas salina.

Como um primeiro passo, uma dose congelada de cada linhagem bacteriana, a ser utilizada nos grupos experimentais, foi plaqueada para a contagem das UFC. A linhagem com maior quantidade média de UFC/mL na DO_{600} de 1,0 foi *L. lactis* MG1363, onde verificou-se 5×10^8 UFC/mL, e a linhagem com menor quantidade média de UFC/mL foi *L. lactis* FnBPA, com $2,8 \times 10^8$ UFC/mL (Tabela 6).

Tabela 6: Unidades formadoras de colônia das diferentes linhagens utilizadas nos experimentos de imunização.

Linhagem bacteriana	Densidade Óptica (DO_{600})	Unidades Formadoras de colônia (UFC/mL)
<i>L. lactis</i> MG1363	1,0	5×10^8
<i>L. lactis</i> MG1363(pValac:ESAT-6)	1,0	$4,3 \times 10^8$
<i>L. lactis</i> FnBPA	1,0	$2,8 \times 10^8$
<i>L. lactis</i> FnBPA(pValac:ESAT-6)	1,0	$3,3 \times 10^8$

V.4.1 Caracterização do perfil da resposta imune celular

O perfil de resposta imune celular foi obtido, avaliado e caracterizado a partir da cultura celular do baço de animais imunizados, orogastricamente (por gavagem), com os grupos descritos no item V.4.

Todos os resultados apresentados na sequência desta seção foram obtidos a partir de esplenócitos murinos estimulados com a proteína recombinante rESAT-6, subtraindo o valor basal de citocinas pré-formadas e obtidas para cada animal não estimulado, ou seja, esplenócitos que receberam como “estímulo” apenas o meio RPMI completo. Além disto, todos os gráficos, a seguir, foram gerados utilizando o programa *GraphPad*

Prism e estatisticamente analisados pelo teste de variância *One-Way ANOVA*, seguido do pós teste *Bonferroni: compare all pairs of Columns*. Os resultados estão representados nos gráficos como a média e o erro padrão da média (SEM, *Standard error of the mean*).

V.4.1.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-12 nos esplenócitos dos animais imunizados com as diferentes linhagens de *L. lactis*

Com o intuito de determinar se o padrão de resposta imune celular, do tipo Th1, foi gerado, após a imunização dos camundongos com as diferentes linhagens de *L. lactis*, a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-12 foram avaliadas por ELISA no sobrenadante das culturas de esplenócitos estimulados.

A Figura 22 mostra os resultados obtidos por ELISA para a citocina IFN- γ , onde foi possível verificar diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,01$), do grupo imunizado com a linhagem *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (FE) em relação a todos os outros grupos experimentais testados.

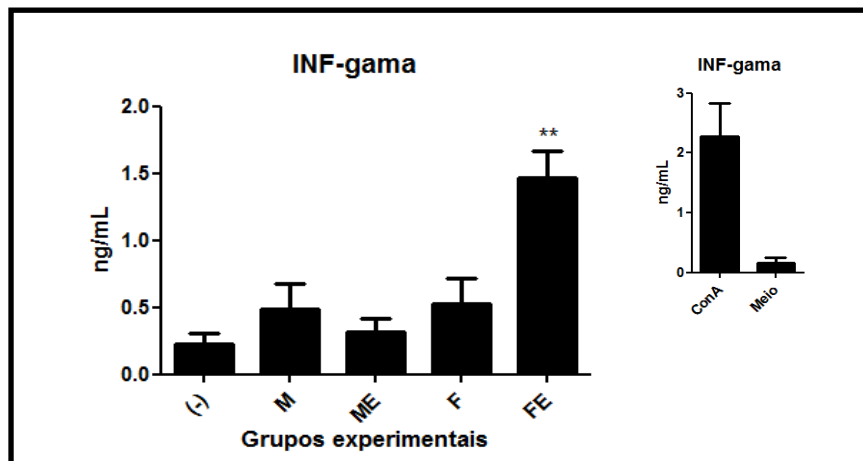


Figura 22: Indução da produção de IFN- γ pelos esplenócitos dos animais imunizados com as linhagens de *L. lactis*. Resultados obtidos após 60 horas de estímulo da cultura de esplenócitos com rESAT-6, representados como a média \pm SEM de dois experimentos independentes (n=10). Grupos experimentais: (-): Negativo; M: *L. lactis* MG1363; ME: *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6); F: *L. lactis* FnBPA; FE: *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). O mitógeno de concanavalina A (ConA) foi utilizado como controle positivo da cultura. P value: ** $p < 0,01$ em relação a todos os grupos testados.

Com relação às citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF- α , não foi verificada diferença, estatisticamente significativa, entre os grupos experimentais testados, como demonstrado na figura 23. Sendo assim, estas duas citocinas não foram estimuladas diferencialmente.

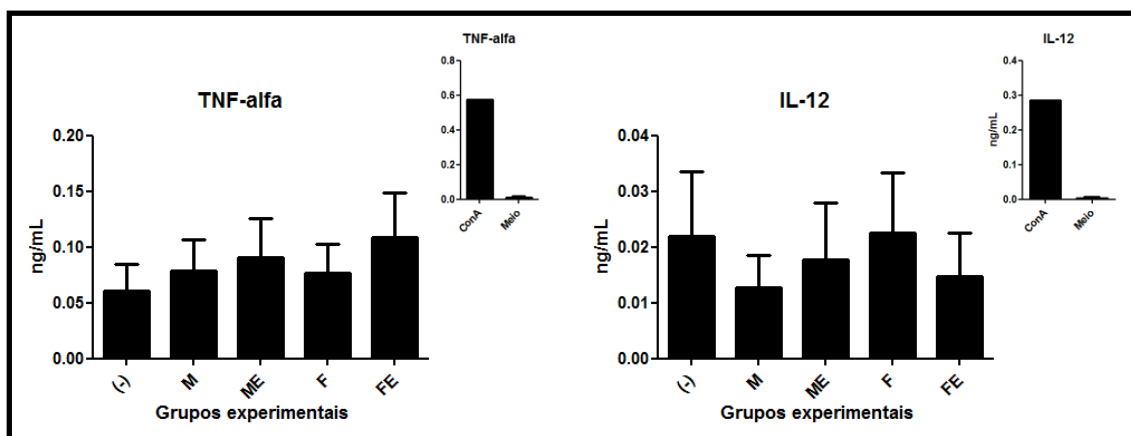


Figura 23: Indução da produção de TNF- α e IL-12 pelos esplenócitos dos animais imunizados com as linhagens de *L. lactis*. Resultados obtidos após 60 horas de estímulo da cultura de esplenócitos com rESAT-6, representados como a média \pm SEM de dois experimentos independentes (n=10). Grupos experimentais: (-): Negativo; M: *L. lactis* MG1363; ME: *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6); F: *L. lactis* FnBPA; FE: *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). O mitógeno de concanavalina A (ConA) foi utilizado como controle positivo da cultura. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

A resposta imune celular aqui observada, obtida com a utilização da linhagem *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), está de acordo com os resultados obtidos em diversos trabalhos, haja vista que estes tem demonstrado que o antígeno ESAT-6 desempenha um importante papel na resposta de células T, na primeira fase da infecção, com um grande número de epítomos descritos (Ravn *et al.*, 1999; Pollock e Andersen *et al.*, 1997; Elhay *et al.*, 1998; Lalvani *et al.*, 2001b; Mustafa *et al.*, 2000; Mustafa *et al.*, 2003).

Além disto, vários trabalhos, utilizando ESAT-6, como uma vacina de DNA, têm demonstrado resultados semelhantes aos obtidos neste experimento de imunização, com uma produção significativa de IFN- γ (Fan *et al.*, 2007; Chang-hong *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009b; Yuan *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012); evidenciando o padrão de

resposta Th1 gerado por este antígeno vacinal, necessário à proteção contra *M. tuberculosis* (Xu *et al.*, 2008a; Gao *et al.*, 2009a; Wang *et al.*, 2004).

Mais especificamente, como vacina de DNA de mucosas, também foi demonstrado (Dou *et al.*, 2012) que a utilização intranasal da vacina de DNA nu, expressando a proteína de fusão Ag85A-ESAT-6-IL-21, em combinação com a BCG intranasal também demonstrou resultados promissores quanto à produção de IFN- γ , além de diminuição da presença bacteriana nos pulmões, após o desafio.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Wang *et al.* (2009) com o mesmo antígeno, em um trabalho onde a via orogástrica e o método de entrega (bacteriano – *Salmonella typhimurium* atenuada) são semelhantes ao trabalho aqui apresentado. Os autores obtiveram com a vacina de DNA codificando a proteína de fusão ESAT6-Ag85B [SL(E6-85B)] uma forte resposta imune do tipo Th1, com grande porcentagem de células T CD8+ produtoras de IFN- γ , além de maior proliferação de células T CD4+ e T CD8+ específicas.

V.4.1.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem das citocinas IL-10 e IL-4 nos esplenócitos dos animais imunizados com as diferentes linhagens de *L. lactis*

Baseado nos resultados anteriores e com o objetivo de confirmar a ausência do padrão de resposta imune do tipo Th2, após a imunização dos camundongos com as linhagens de *L. lactis*, a produção da citocina IL-4 foi avaliada por ELISA. Além disto, a citocina regulatória IL-10 também foi medida no sobrenadante das culturas de esplenócitos estimulados.

A Figura 24 mostra os resultados obtidos no ensaio de ELISA para as citocinas citadas, onde não foi possível detectar diferença, estatisticamente significativa, entre os grupos experimentais testados, tanto para IL-10 quanto para IL-4. A IL-4 foi detectada em uma pequena quantidade (aproximadamente 0,003 ng/mL), abaixo do nível de detecção dos kits de ELISA utilizados neste experimento. Assim, pode-se concluir uma ausência da detecção de IL-4 e do perfil imune celular do tipo Th2.

Poucos são os trabalhos que analisaram IL-10 e IL-4, após a vacinação com DNA codificando ESAT-6, já que estas citocinas não são tão relevantes na resposta e proteção contra a TB. Em um trabalho, utilizando ESAT-6 como vacina de DNA, foi

verificado tanto um nível mais elevado de proliferação de linfócitos quanto a produção mais elevada das citocinas IFN- γ e IL-2, por células do baço; com diminuição nos níveis da citocina do perfil Th2 (IL-4) e IL-10, nos grupos que receberam a vacina de DNA, em comparação com os grupos que receberam a BCG (Xu *et al.*, 2008a).

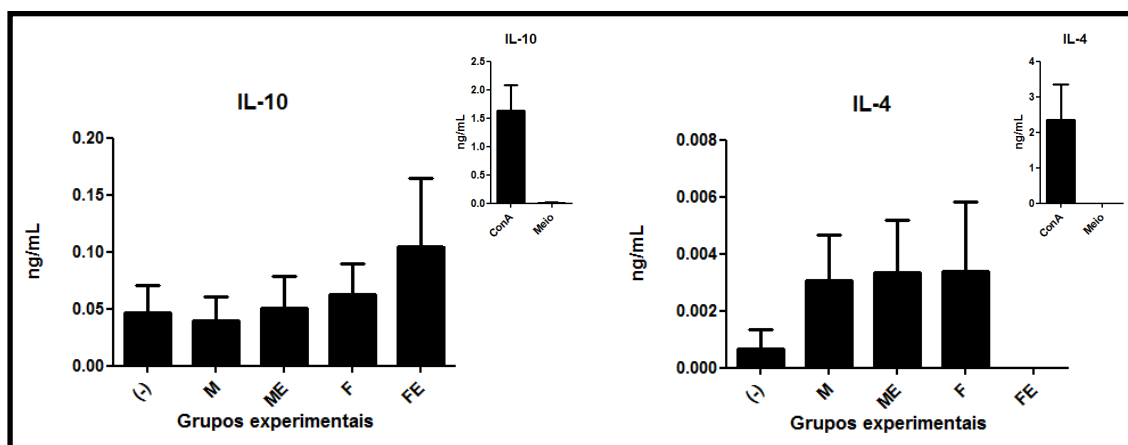


Figura 24: Indução da produção de IL-10 e IL-4 pelos esplenócitos dos animais imunizados com as linhagens de *L. lactis*. Resultados obtidos após 60 horas de estímulo da cultura de esplenócitos com rESAT-6, representados como a média \pm SEM de dois experimentos independentes (n=10). Grupos experimentais: (-): Negativo; M: *L. lactis* MG1363; ME: *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6); F: *L. lactis* FnBPA; FE: *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). O mitógeno de concanavalina A (ConA) foi utilizado como controle positivo da cultura. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Por fim, de acordo com os resultados obtidos para a resposta imune celular, com aumento significativo da citocina IFN- γ , pôde-se confirmar a imunogenicidade do antígeno ESAT-6 que, durante a infecção natural, também é capaz de gerar um perfil de resposta Th1. Na vacinação com DNA, a manutenção ou a geração deste tipo de resposta é necessária para controle e/ou proteção contra o *M. tuberculosis*. Sendo assim, provavelmente, a resposta imune gerada, após a imunização com *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), foi devida à presença do antígeno ESAT-6; resposta esta otimizada pela linhagem invasiva, ao passo que para as citocinas IL-10 e IL-4 não houve diferença significativa ou detecção, respectivamente.

V.4.2 Caracterização do Perfil da Resposta Imune Humoral

O perfil de resposta imune humoral de mucosas foi avaliado a partir das fezes e do cólon dos animais imunizados com as referidas linhagens de *L. lactis*. Já a resposta imune humoral sistêmica foi avaliada a partir do soro dos animais.

Todos os gráficos, a seguir, foram gerados utilizando o programa *GraphPad Prism* e estatisticamente analisados pelo teste de variância *One-Way ANOVA* seguido do pós teste “*Bonferroni compare all pairs of Columns*” ou “*Dunnett's Multiple Comparison Test*”. Os resultados estão representados nos gráficos como a média e o erro padrão da média (SEM).

V.4.2.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de sIgA no cólon e nas fezes

A produção de sIgA foi avaliada por ELISA com o intuito de verificar se houve resposta imune de mucosas após a imunização dos camundongos com as diferentes linhagens de *L. lactis*.

A Figura 25 mostra os resultados obtidos para sIgA, específica para ESAT-6, medida nas fezes dos animais durante final do experimento de imunização. Um dia após a última imunização, não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os grupos. Já após 7 dias da última imunização, foi possível verificar um aumento, de sIgA no grupo *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (FE), estatisticamente significativo, em relação aos demais grupos, exceto com relação ao grupo *L. lactis* FnBPA (F). No final do experimento, 14 dias após a última imunização, houve um aumento, estatisticamente significativo, de sIgA nas fezes do grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (FE), com relação o todos os outros grupos testados.

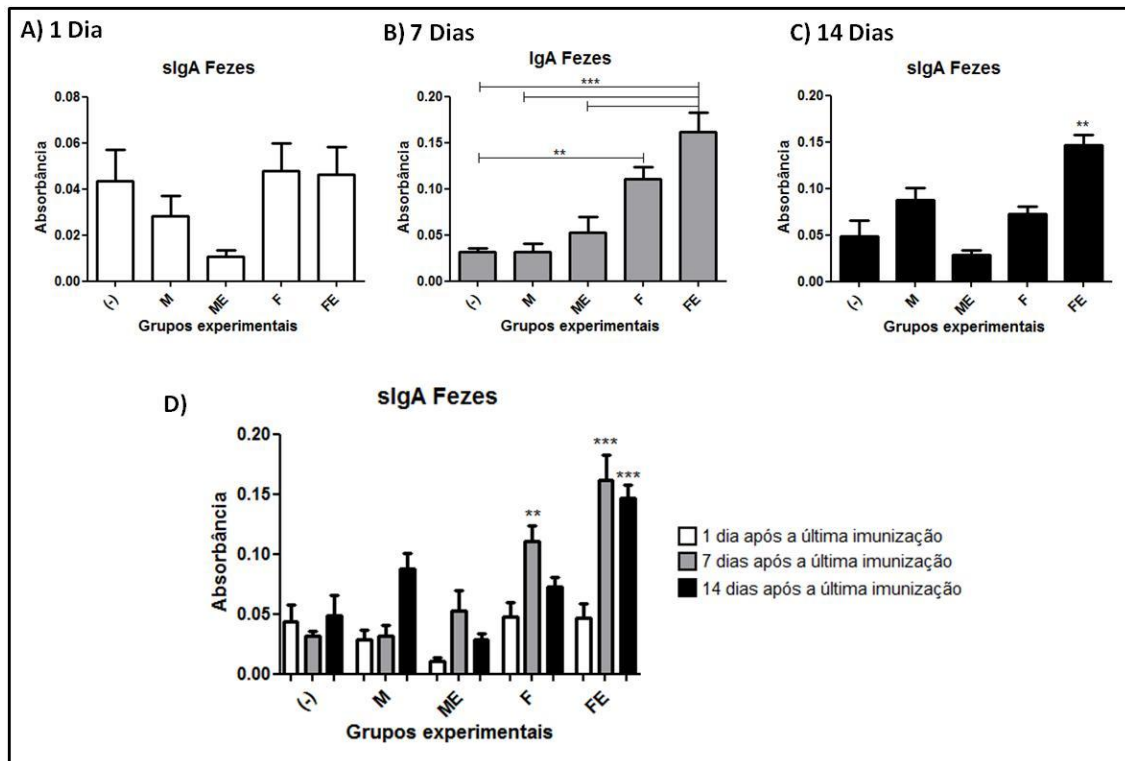


Figura 25: Cinética da produção de sIgA específica nas fezes dos animais imunizados com as linhagens de *L. lactis*. Resultados obtidos com A) 1 dia, B) 7 dias e C) 14 dias após última imunização. D) Visualização de todos os tempos de produção de sIgA. Resultados representados como a média \pm SEM de dois experimentos independentes (n=10). Grupos experimentais: (-): Negativo; M: *L. lactis* MG1363; ME: *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6); F: *L. lactis* FnBPA; FE: *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). P value: **p<0,01 e ***p<0,001, sendo em B) conforme esquematizado na figura; C) em relação a todos os grupos experimentais e D) em relação ao grupo (-) no mesmo tempo experimental.

Além disso, também foi observado que houve um aumento, estatisticamente significativo, de sIgA anti-ESAT-6, no cólon dos animais que receberam *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (FE), em relação a todos os demais grupos testados (Figura 26). No cólon dos animais também foi possível detectar 2 vezes mais sIgA, anti-ESAT-6, do que no macerado das fezes destes animais; o que, provavelmente, pode ser devido à menor presença de proteases no tecido do cólon em relação às fezes.

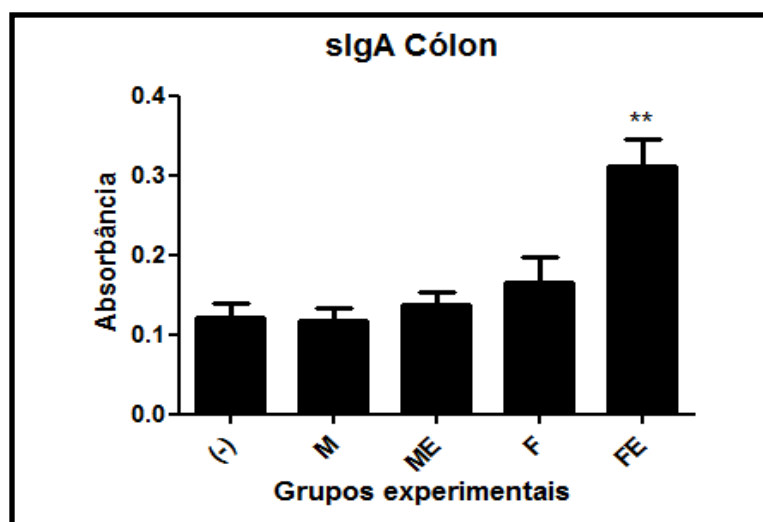


Figura 26: Produção de sIgA específica no macerado do c6lon dos animais imunizados com as linhagens de *L. lactis*. Resultados representados como a média \pm SEM de dois experimentos independentes (n=10). Grupos experimentais: (-): Negativo; M: *L. lactis* MG1363; ME: *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6); F: *L. lactis* FnBPA; FE: *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). P value: **p<0,01 em rela77o a todos os grupos experimentais.

Wang *et al.* (2009), em um trabalho semelhante ao aqui apresentado, contudo utilizando *Salmonella typhimurium* atenuada para a entrega oral de DNA codificando a prote6na de fus7o ESAT-6/Ag85B [SL(E6-85B)], tamb6m verificaram aumento significativo de IgA, espec6fica, no soro e nos tecidos do intestino, est6mago e pulm7o dos animais imunizados, com n6veis, estatisticamente maiores, se comparados 7 BCG sozinha. Al6m disto, no regime *prime-boost*, a combina77o da vacina de DNA [SL(E6-85B)] com a BCG, foi observado uma maior produ77o de sIgA se comparada 7 vacina [SL(E6-85B)] sozinha, sendo no tecido intestinal encontrado os maiores n6veis desta imunoglobulina.

Em outro trabalho, foi utilizado tamb6m a via de mucosas, por6m intranasal, para imuniza77o com DNA expressando a prote6na de fus7o Ag85A-ESAT-6-IL-21 como *prime* e a BCG, tamb6m intranasal, como *boosting*. Neste contexto, resultados promissores foram obtidos, com aumento de sIgA no lavado bronqu6olo-alveolar, al6m de diminui77o da presen77a bacteriana nos pulm7es dos camundongos imunizados no regime *prime-boost* comparado 7 BCG sozinha, intranasal ou subcut7nea (Dou *et al.*, 2012).

Sendo assim, ap6s a imuniza77o com as diferentes linhagens de *L. lactis* no presente trabalho, foi poss6vel detectar um aumento, estatisticamente significativo, da

resposta imune humoral de mucosas; resposta esta verificada pelo aumento da sIgA específica para ESAT-6 nas fezes e cólon dos animais imunizados com a linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). A presença de sIgA tem papel fundamental para a proteção das mucosas, atuando como uma das principais responsáveis pela barreira imune durante a infecção inicial pelo *M. tuberculosis*.

V.4.2.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem dos anticorpos IgA, IgG, IgG1 e IgG2a séricos

Com o intuito de verificar se houve resposta imune sistêmica após a imunização dos camundongos com as linhagens de *L. lactis* e também verificar se houve uma variação nesta resposta, durante todo o processo de imunização, a produção de IgA, IgG, IgG1 e IgG2a, específicas para ESAT-6, foi avaliada. O ELISA foi realizado a partir do soro dos animais, coletados duas semanas após a primeira, segunda e terceira administração orogástrica das linhagens de *L. lactis* aos animais.

A Figura 27 mostra os resultados obtidos para IgA sérica, anti-ESAT-6, onde foi possível verificar, no grupo imunizado com *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (FE), um aumento, estatisticamente significativo, em relação ao controle negativo, duas semanas após a 2ª imunização (tempo 2). Já duas semanas após a 3ª imunização (tempo 3), esta diferença também foi observada para o grupo *L. lactis* FnBPA (F) e *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6) (ME). Porém, o grupo *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (FE), no tempo 2, não diferiu, estatisticamente, do grupo *L. lactis* FnBPA (F) (dados estatísticos não demonstrados na figura). No tempo 3, o grupo *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (FE) não diferiu, estatisticamente, dos grupos *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6) (ME) e *L. lactis* FnBPA (F) (dados estatísticos não demonstrados na figura). Sendo assim, não foi, estatisticamente possível, confirmar um aumento de IgA sérica, após a imunização dos camundongos com as linhagens de *L. lactis*.

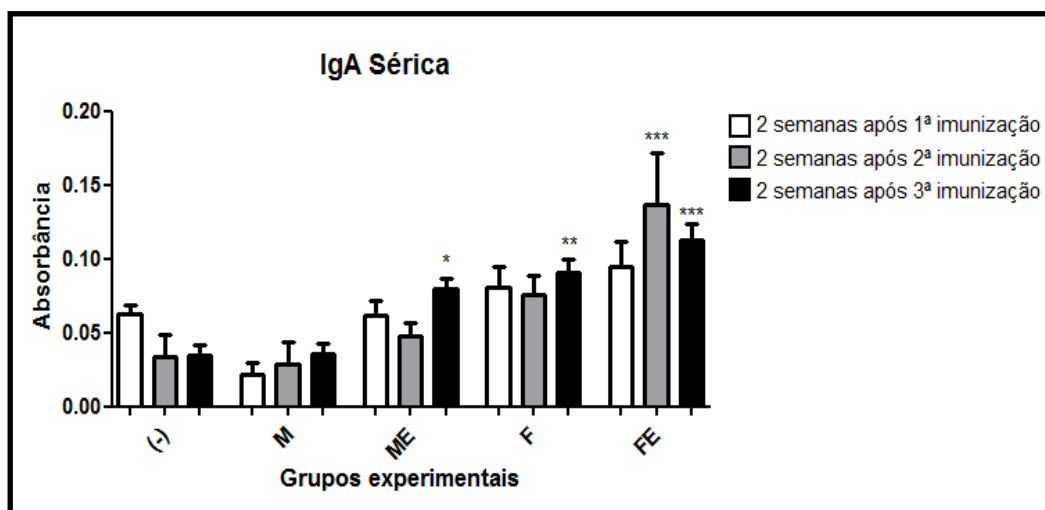


Figura 27: Avaliação da presença de IgA específica no soro dos animais imunizados com as linhagens de *L. lactis*. Resultados representados como a média \pm SEM de quatro experimentos independentes. Grupos experimentais: (-): Negativo; M: *L. lactis* MG1363; ME: *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6); F: *L. lactis* FnBPA; FE: *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo (-) no mesmo tempo experimental.

As Figuras 28, 29 e 30 mostram os resultados obtidos para IgG, IgG1 e IgG2a, respectivamente, nos três tempos analisados. Para IgG e IgG2a, não houve diferença, estatisticamente significativa, de nenhum dos grupos experimentais em relação ao grupo controle negativo, o qual recebeu, orogastricamente, apenas salina. Apenas para IgG1, houve um aumento visual no tempo 3 do grupo *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (FE), estatisticamente significativo em relação ao negativo. Entretanto, não houve diferença, estatisticamente significativa, entre este grupo e o grupo *L. lactis* FnBPA (F), não sendo possível considerar que, neste caso, houve aumento de IgG1.

Além disto, foi utilizado um soro como controle positivo para Ig anti-ESAT-6 para confirmar que havia detecção ou ainda que a técnica aqui adotada era funcional, ou seja, capaz de detectar as IgG e seus isotipos anti-ESAT-6. Para isto, camundongos que receberam a proteína rESAT-6, em hidróxido de alumínio, tiveram seu soro coletado. Este soro, positivo, foi utilizado no ELISA como controle de detecção, como apresentado abaixo de cada figura. Assim, pôde-se confirmar a confiabilidade da técnica e também a ausência de estimulação da resposta humoral sistêmica neste trabalho.

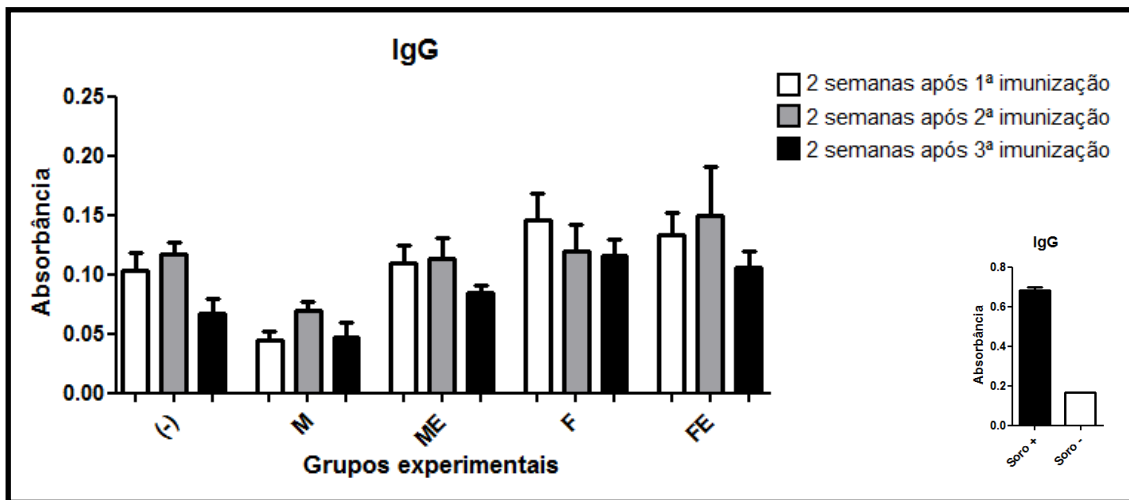


Figura 28: Avaliação da presença de IgG específica no soro dos animais imunizados com as linhagens de *L. lactis*. Resultados representados como a média \pm SEM de quatro experimentos independentes. Grupos experimentais: (-): Negativo; M: *L. lactis* MG1363; ME: *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6); F: *L. lactis* FnBPA; FE: *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). Soro+ para ESAT-6. Foi considerado como diferença estatisticamente significativa quando $*p < 0,05$, considerando cada grupo em relação ao grupo (-) no mesmo tempo experimental.

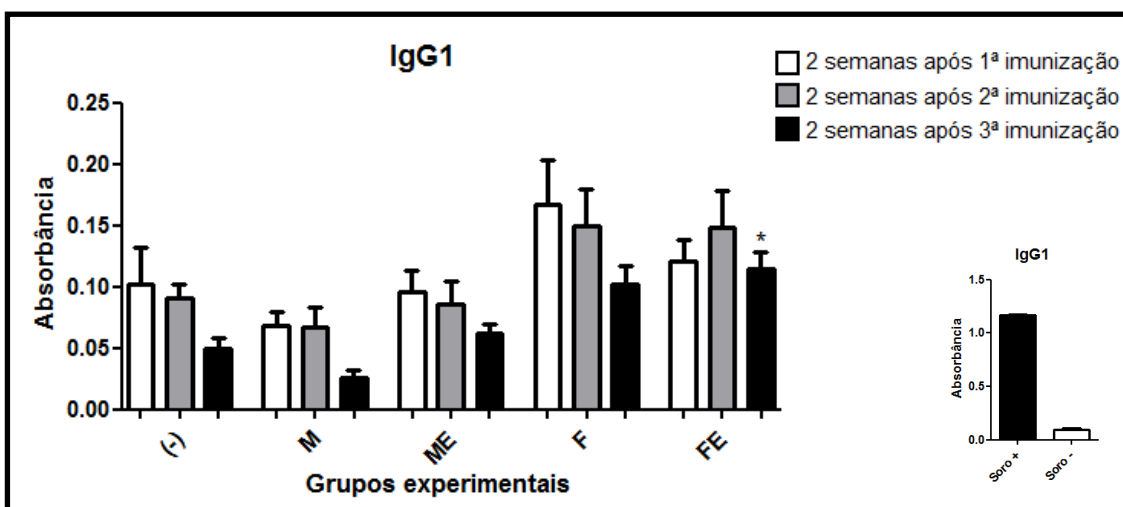


Figura 29: Avaliação da presença de IgG1 específica no soro dos animais imunizados com as linhagens de *L. lactis*. Resultados representados como a média \pm SEM de quatro experimentos independentes. Grupos experimentais: (-): Negativo; M: *L. lactis* MG1363; ME: *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6); F: *L. lactis* FnBPA; FE: *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). Soro+ para ESAT-6. Foi considerado como diferença estatisticamente significativa quando $*p < 0,05$, considerando cada grupo em relação ao grupo (-) no mesmo tempo experimental.

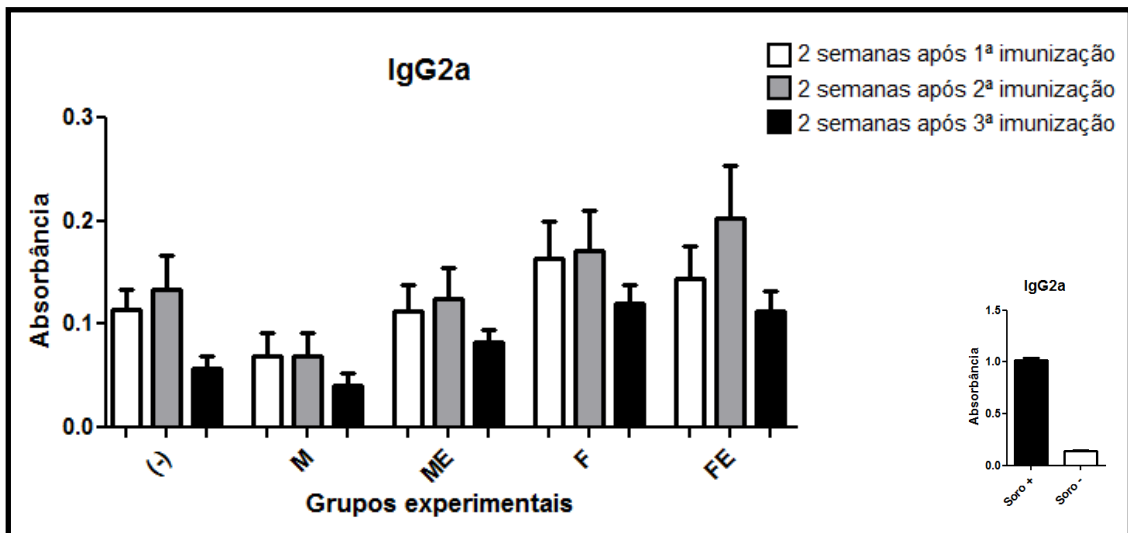


Figura 30: Avaliação da presença de IgG2a específica no soro dos animais imunizados com as linhagens de *L. lactis*. Resultados representados como a média \pm SEM de quatro experimentos independentes. Grupos experimentais: (-): Negativo; M: *L. lactis* MG1363; ME: *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6); F: *L. lactis* FnBPA; FE: *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). Soro+ para ESAT-6. Foi considerado como diferença estatisticamente significativa quando $*p < 0,05$, considerando cada grupo em relação ao grupo (-) no mesmo tempo experimental.

Alguns trabalhos detectaram diferenças destas Igs após a imunização de mucosas com DNA codificando ESAT-6. Wang *et al.* (2009) detectaram aumento nos níveis de IgG, específica, nos grupos que receberam tanto a vacina de DNA, entregue por *S. typhimurium* atenuada [SL(E6-85B)], quanto na combinação desta com a BCG. Além disto, um aumento expressivo de IgG2a, em relação a IgG1, também foi verificado para estes dois grupos; o que é indicativo de uma resposta direcionada para patógenos intracelulares, como é o caso do *M. tuberculosis*.

Neste contexto, uma das hipóteses para a ausência de uma resposta imune humoral sistêmica baseada no sistema de entrega vacinal aqui testado, seria o fato de que o plasmídeo é entregue a um pequeno número de enterócitos (Pontes *et al.*, 2012; Del Carmen *et al.*, 2013). Assim, estas células seriam capazes de gerar apenas uma pequena quantidade da proteína para a apresentação ao sistema imune que, provavelmente, não foi suficiente para a ativação de células B em plasmócitos, tampouco para a detecção de diferença na produção de IgGs.

Como já explicitado, a forma de apresentação antigênica, através de uma vacina de DNA, é, primariamente, via MHC, sendo estas moléculas reconhecidas por receptores de células T (TCRs). Para a ativação de linfócitos B por antígenos proteicos,

estes devem se encontrar extracelularmente para reconhecimento e ligação ao receptor de células B (BCR), com posterior processamento do antígeno pelas células B e apresentação do mesmo às células T CD4, necessárias para a geração de plasmócitos de longa vida (Andrew *et al.*, 2012).

Apesar da formulação vacinal testada neste trabalho não apresentar aumento da resposta imune humoral sistêmica, sabe-se que a resposta primária, frente à infecção pelo *M. tuberculosis*, e responsável por gerar uma proteção vacinal, é, principalmente, uma resposta imune celular. Além disto, visto que as vacinas de DNA mimetizam uma infecção natural, como a que ocorre por *M. tuberculosis*, os antígenos são produzidos intracelularmente e apresentados ao sistema imune. Assim, a principal resposta a estes antígenos é a proliferação de linfócitos TCD4+ e TCD8+ e a produção de citocinas, em especial IFN- γ , capaz de aumentar a resposta microbiocida dos macrófagos infectados. Já a resposta de anticorpos ao referido bacilo é, praticamente, ausente na infecção natural.

V.4.3 Análise de células TCD4+ e TCD8+ produtoras de IFN- γ

Para se entender quais populações de células T estavam sendo ativadas e gerando a resposta imune celular observada anteriormente, com a produção significativa de IFN- γ , foi realizada a marcação dos esplenócitos murinos estimulados com rESAT-6. Para isto, foram utilizados anticorpos para CD4, CD8 e IFN- γ e as diferentes populações celulares foram analisadas por citometria de fluxo. Na análise, primeiramente foi separada a população de células T CD8+ ou T CD4+ e, posteriormente, foi analisada a porcentagem destas células produtoras de IFN- γ . Após a análise, verificou-se um aumento, estatisticamente significativo, da presença de IFN- γ intracelular em células T CD8+ e T CD4+. O aumento foi verificado no grupo que recebeu a linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (FE), única com diferença, estatisticamente significativa, em comparação ao grupo controle negativo (Figura 31). Neste caso, foi possível verificar que cerca de 13% das células T CD8+ e cerca de 1,8% das T CD4+ produziam IFN- γ no grupo FE.

Porém, o grupo *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (FE), apesar de ser o único, estatisticamente aumentado, em relação ao grupo negativo, diferiu apenas do grupo *L. lactis* FnBPA (F) para a porcentagem de células T CD4+ produtoras de INF- γ . Já para a

porcentagem de células T CD8+ produtoras de INF- γ , o grupo *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (FE) diferiu apenas do grupo *L. lactis* MG1363(pValac:ESAT-6) (ME), não diferindo das demais linhagens bacterianas testadas. Assim, não foi possível confirmar, por citometria de fluxo, um aumento de células T CD4+ ou T CD8+ específicas ao estímulo com rESAT-6, e produtoras de INF- γ , após a imunização com a linhagem *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (FE).

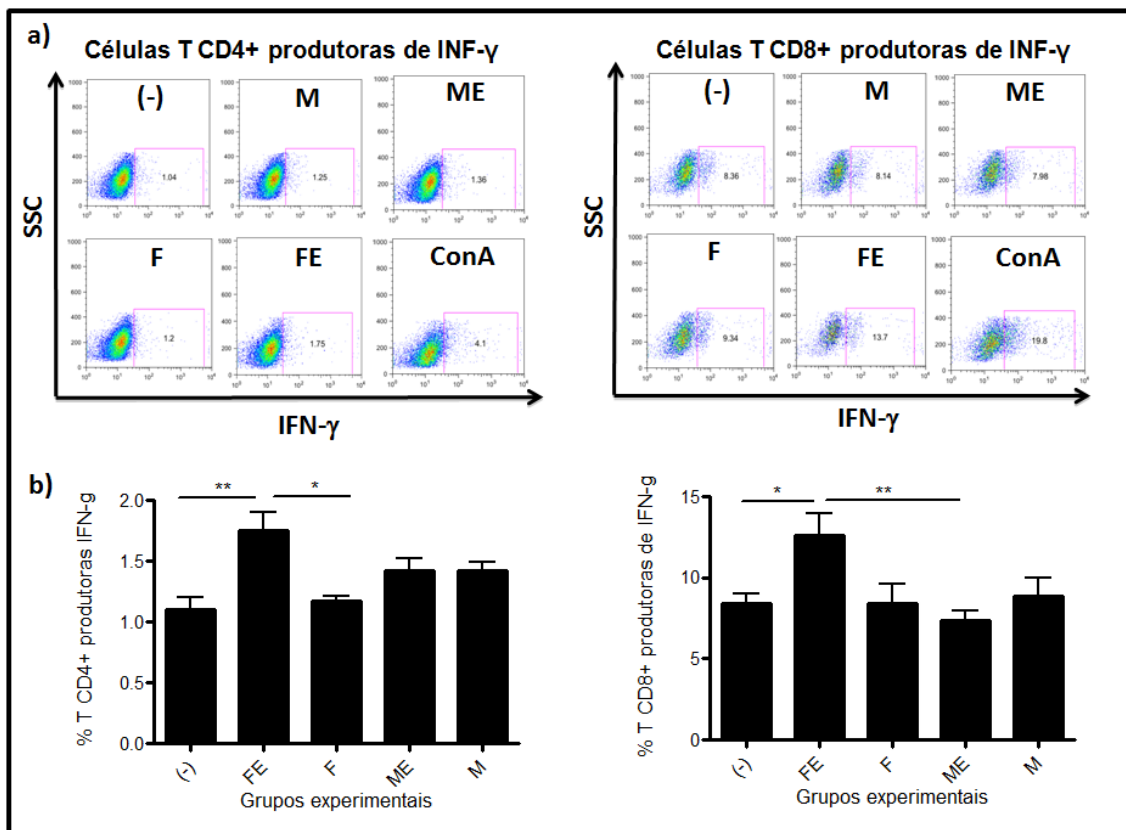


Figura 31: Análise de células T CD4+ e T CD8+ produtoras de IFN- γ por citometria de fluxo. A) Dot Plot mostrando a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+ e CD8+, respectivamente. B) Porcentagens de linfócitos T CD4+ e T CD8+ produtores de IFN- γ . Resultados representam a média \pm SEM de experimento representativo de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os resultados foram obtidos a partir da cultura de esplenócitos, estimuladas com rESAT-6, por 12 horas e marcadas com anti CD8-FITC, anti-CD4-PE CY5 e anti-IFN- γ -PE.

Wang *et al.*, (2009) verificaram também um aumento na proporção de células T CD4+ e T CD8+ após a administração oral de *S. typhimurium* atenuada para a entrega da vacina de DNA. Foi demonstrado que, após a imunização de camundongos com a linhagem [SL(85B)], cerca de 12% das células T CD8+ e cerca de 10% das células T

CD4⁺ também expressavam IFN- γ intracelular. Com a proteína de fusão [SL(E6-85B)], esta porcentagem aumentou para 21,8% para T CD8⁺ e 15% para T CD4⁺ produtoras de IFN- γ intracelular.

O possível aumento de IFN- γ , intracelular, em células T CD4⁺ e T CD8⁺ foi um resultado que, aliado aos demais resultados até então apresentados, confirma a funcionalidade do sistema aqui utilizado. As células T CD8⁺ são as principais envolvidas na resposta a antígenos produzidos de forma intracelular, como ocorre na produção de um antígeno codificado por uma vacina de DNA. A apresentação do antígeno via MHC-I permite ao sistema imunológico detectar as células expressando ESAT-6, como enterócitos infectados e também DCs, que são capazes de engolfar *L. lactis* a partir do lúmen intestinal e expressar o referido antígeno, apresentando-o pela via citosólica (MHC-I). Além disso, as APCs, principalmente as DCs, se não diretamente infectadas, podem adquirir o antígeno exógeno a partir da fagocitose de enterócitos infectados, apresentando o antígeno pela via MHC-II. Neste contexto, estas mesmas células (DCs) estão, diretamente, envolvidas com a ativação de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺.

É proposto, ainda, que as DCs, por um mecanismo conhecido como apresentação cruzada (*cross-presentation* ou *cross-priming*), são capazes de apresentar o antígeno também pela via MHC-I após a fagocitose de células infectadas ou fragmentos celulares, normalmente apresentados via MHC-II (Joffre *et al.*, 2012). Este processo envolve a fusão do fagossomo ao retículo endoplasmático, fazendo com que as proteínas ingeridas sejam translocadas para o citosol, onde ocorre a degradação proteossômica, e os peptídeos derivados são então apresentados via MHC-I. Assim, as DCs são consideradas as melhores APC na indução das respostas primárias das células T CD8⁺ (Andrew *et al.*, 2012).

Enfim, diante de todos os resultados apresentados, foi possível confirmar a modulação de um perfil imune celular do tipo Th1, com o aumento da produção de IFN- γ , detectado por ELISA, e um possível aumento de células T CD4⁺ e TCD8⁺ produtoras de IFN- γ , ambos para o grupo que recebeu *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6).

VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

VI.1 Conclusão geral

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem chegar à seguinte conclusão geral:

- ✓ Foi possível confirmar a funcionalidade do sistema de entrega, oral, de DNA, pela linhagem *L. lactis* FnBPA, sendo este, baseado em todos os resultados aqui obtidos, mais efetivo na indução de uma resposta imune específica para ESAT-6 *in vivo* em relação a linhagem selvagem *L. lactis* MG1363.

VI.2 Conclusões específicas

Os resultados apresentados permitem chegar às seguintes conclusões específicas:

- ✓ *In vitro*, através da cocultura de macrófagos, não foi possível verificar a resposta imune específica ao antígeno ESAT-6. Porém, foi possível verificar um aumento, estatisticamente significativo, da produção de TNF- α , IL-6 e IL-12 para as linhagens não invasivas, e um aumento, também estatisticamente significativo, de TNF- α e IL-6, para as linhagens invasivas de *L. lactis*, não havendo influência aparente do antígeno ESAT-6;
- ✓ O padrão de resposta imune celular, observado para *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), em camundongos Balb/C, foi do padrão Th1, evidenciado pela produção, estatisticamente significativa, da citocina pró-inflamatória IFN- γ e o possível aumento de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de IFN- γ , além da ausência da citocina anti-inflamatória IL-4. Para as citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10, não houve diferença significativa;
- ✓ Houve estimulação, estatisticamente significativa, da produção de sIgA anti-ESAT-6 nas fezes e cólon dos animais imunizados com a linhagem de *L. lactis*

FnBPA(pValac:ESAT-6), evidenciando assim a presença de uma resposta imune de mucosas específica;

- ✓ Não foi detectado diferença estatística para as Ig séricas IgA, IgG, IgG1 e IgG2a específicas para ESAT-6, indicando a provável ausência da estimulação de uma resposta imune humoral sistêmica após a imunização dos animais com as linhagens de *L. lactis*;

VI.3 Perspectivas

A construção do plasmídeo pValac:ESAT-6, funcional, e da linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) (Pereira, V. B. – dissertação de mestrado), possibilitou a realização do trabalho aqui apresentado. Assim, os experimentos de imunização oral realizados responderam a perguntas básicas com relação ao sistema de entrega (*L. lactis* FnBPA) e ao vetor vacinal (pValac:ESAT-6), sendo possível a confirmação, através da produção de IFN- γ e sIgA, de um sistema funcional e capaz de gerar uma resposta imune celular e humoral de mucosas específica, em camundongos imunizados com a linhagem *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6).

Neste contexto, utilizando a bactéria invasiva (*L. lactis* FnBPA) para a entrega oral da vacina de DNA pValac:ESAT-6, existem diversas perspectivas para a continuidade do projeto. Com o objetivo de aumentar a imunogenicidade da vacina de DNA *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), propõe-se um regime de imunização tipo *prime-boost*, onde camundongos, primeiramente, vacinados com uma dose da vacina BCG, subcutânea, receberão o reforço com a “vacina de DNA” [*L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6)] aqui caracterizada. Para isto, e baseado nos resultados aqui obtidos, apenas as linhagens invasivas serão testadas, acrescentando aos grupos iniciais [*L. lactis* FnBPA e *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6)], um novo grupo, o BCG *prime*, subcutânea, seguido de DNA *boost* *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6), além do controle BCG, subcutânea, sozinha.

Este sistema *prime-boost* de vacinação vêm sendo testado com sucesso por vários pesquisadores, inclusive para vacinas de DNA utilizando ESAT-6, e entregues pela via oral, por bactérias patogênicas atenuadas (Wang *et al.*, 2009). Neste caso, a

combinação da BCG como *prime* e da vacina de DNA como *boost* foi mais efetiva que ambas as vacinas sozinhas. Além disto, este sistema mimetiza a real situação da população mundial, já que mais de 3,5 bilhões de pessoas já foram vacinadas com a BCG, sendo esta a vacina a mais amplamente utilizada no mundo. Sendo assim, o desenvolvimento de uma intervenção vacinal que possa aumentar a imunidade de indivíduos já vacinados com a BCG, certamente, é uma das medidas que poderia ter um grande impacto sobre o número de novos casos de tuberculose na população adulta mundial.

Por fim, espera-se que, com a continuidade deste projeto, a eficácia e efetividade de vacinas gênicas veiculadas por bactérias lácticas invasivas, por via de administração em mucosas, sejam estabelecidas com sucesso. Com isto, este sistema vacinal poderá ser utilizado para a pesquisa e o desenvolvimento de outras vacinas de DNA contra demais patógenos, com aplicações nos campos de imunização e imunomodulação.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alderson, M.R.; Bement, T.; Day, C.H.; Zhu, L.; Molesh, D.; Skeiky, Y.A.; Coler, R.; Lewinsohn, D.M.; Reed, S.G.; Dillon, D.C. (2000). Expression cloning of an immunodominant family of Mycobacterium tuberculosis antigens using human CD4(+) T cells. J. Exp. Med. 191, 551–560.

Andersen, P.; Askgaard, D.; Bennedsen, J.; Heron I. (1991) Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. Infect. Immun. 59, 1905–1910.

Andersen, P.; Andersen, A.B.; Sorensen, A.L.; Nagai, S. (1995) Recall of long-lived immunity to Mycobacterium tuberculosis infection in mice. J. Immunol. 154, 3359–3372.

Andersen, P.; Munk, M.E ; Pollock, J.M.; Doherty, T.M. (2000). Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet 356, 1099–1104.

Andrew, H. L.; Abul, K. A; Shiv, P. (2012) Imunologia – Celular e Molecular. Editora Campus, ISBN 9788535247442, 560p.

Angel, J.B.; Cooper, C.L.; Clinch, J.; Young, C.D.; Chenier, A.; Parato, K.G.; Lautru, M.; Davis, H.; Cameron, D.W. (2008) CpG increases vaccine antigen-specific cell-mediated immunity when administered with hepatitis B vaccine in HIV infection. J Immune Based Ther Vaccines; 6:4.

Azevedo, V. and Miyoshi, A. (2004) Novas utilizações Biotecnológicas e terapêuticas das Bactérias do Ácido Lático, cap. 40 (p. 801-818) In Genômica. São Paulo: Editora Atheneu (1114 p.).

Azevedo, V. and Oliveira, S.C. (2003) Vacinas de DNA in Borém, Almeida e Santos: Biotecnologia de A a Z. Universidade Federal de Viçosa, MG.

Babuik, L.A., Pontarollo, R., Babiuk, S., Loehr, B., Van Drunen Little-van den Hurk, S. (2003). Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. Vaccine 21, 649–658.

Bahey-El-Din, M. and Gahan, C.G. (2010a) *Lactococcus lactis*: from the dairy industry to antigen and therapeutic protein delivery. Discov Med. May;9(48):455-61.

Bahey-El-Din M.; Gahan C.G.; Griffin B.T. (2010b) *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. Curr Gene Ther 10(1):34-45.

Barrera, L. The Basics of Clinical Bacteriology. In: Palomino, J. C.; Leão, S. C.; Ritacco, V. (2007) Tuberculosis 2007- From basic science to patient care. Belgium, Brazil, Argentina. www.TuberculosisTextbook.com - p. 93-112.

Behr, M.A.; Wilson, M.A.; Gill, W.P.; Salamon, H.; Schoolnik, G.K.; Rane, S.; Small, P.M. (1999) Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarrays. *Science* 284, 1520–1523.

Behr, M. A. and Small, P. M. (1999) A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine*. 17, 915-922.

Behr-Perst, S. I.; Munk, M.E.; Schaberg, T.; Ulrichs, T.; Schulz, R.J.; Kaufmann, S.H. (1999) Phenotypically activated gammadelta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 180, 141–149.

Behr, M.A. (2001) Correlation between BCG genomics and protective efficacy. *Tuberculosis*; 81(1/2):165–8.

Beck, J.M. (2005) The immunocompromised host: HIV infection. *Proc Am Thorac Soc*. Vol. 2(5), p. 423-427.

Becker, P.D.; Noerder, M.; Guzmán, C.A. (2008) Genetic Immunization: Bacteria as DNA vaccine delivery vehicle. Capítulo 6 (71-97) In Sleator, R. e Hill, C. *Pathobiotechnology: Biotechnology intelligence unit*. Landes Bioscience, 216 p.

Belshe, R.B.; Mendelman, P.M.; Treanor, J.; King, J.; Gruber, W.C.; Piedra, P.; Bernstein, D.I.; Hayden, F.G.; Kotloff, K.; Zangwill, K.; Iacuzio, D.; Wolff, M. (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. *N. Engl. J. Med.* 338, 1405–1412.

Berlin, C.; Berg, E.L.; Briskin, M.J.; Andrew, D.P.; Kilshaw, P.J.; Holzmann, B.; Weissman, I.L.; Hamann, A.; Butcher, E.C. (1993) Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74, 185–195.

Bermúdez-Humarán, L.G.; Langella, P.; Cortez-Perez, N.; Gruss, A.; Tamez-Guerra, R.S.; Oliveira, S.C.; Saucedo-Cardenas, O.; Montes de Oca-Luna, R.; Le Loir, Y. (2003a) Intranasal administration of recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine Interleukine-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production, *Infect. Immun.* 71 1887–1896.

Bermúdez-Humarán, L.G.; Langella, P.; L'Haridon, R.; Gilbert, S.; Commissaire, J.; Le Loir, Y.; Corthier, G. (2003b) Controlled intra- and extracellular production of

staphylococcal nuclease and ovine omega interferon in *Lactococcus lactis*, FEMS Microbiol. Lett. 229 37–42.

Bermúdez-Humarán, L.G.; Corthier, G.; Langella, P. R. (2004) Recent advances in the use of *Lactococcus lactis* as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines. Recent Res. Devel. Microbiology. 8:147-160.

Berthet, F.X.; Rasmussen, P.B.; Rosenkrands, I.; Andersen, P.; Gicquel, B. (1998) A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low- molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). Microbiology 144, 3195–3203.

Biedermann T.; Röcken, M; Carballido J. M. (2004) TH1 and TH2 Lymphocyte Development and Regulation of TH Cell–Mediated Immune Responses of the Skin. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings. 9, 5–14; doi:10.1111/j.1087-0024.2004.00829.x

Black, K. P.; Cummins, J. E. and Jackson, S. (1996) Serum and secretory IgA from HIV-infected individuals mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. Clin. Immunol. Immunopathol. 81, 182–190.

Blomgran, R. and Ernst, J. D. (2011) Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. J. Immunol. 186, 7110–7119.

Blomgran, R., Desvignes, L., Briken, V.; Ernst, J. D. (2012) *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. Cell Host Microbe 11, 81–90.

Bock, N. N.; McGowan, J. E. Jr.; Ahn, J.; Tapia, J.; Blumberg, H.M. (1996) Clinical predictors of tuberculosis as a guide for a respiratory isolation policy. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 154:1468–1472.

Bolotin, A.; Wincker, P.; Mauger, S.; Jaillon, O.; Malarne, K.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S.D.; Sorokin, A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. Genome Res 11:731–753.

Braat, H.; Rottiers, P.; Hommes, D.W.; Huyghebaert, N.; Remaut, E.; Remon, J.P.; van Deventer, S.J.; Neiryck, S.; Peppelenbosch M.P.; Steidler, L. (2006) A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. Clin Gastroenterol Hepatol 4(6):754-9.

Brandt, L.; Elhay, M.; Rosenkrands, I.; Lindblad, E.B.; Andersen, P. (2000) ESAT-6 subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 68, 791–795.

Brandtzaeg, P. Baekkevold, E.S.; Farstad, I.N.; Jahnsen, F.L.; Johansen, F.E.; Nilsen, E.M.; Yamanaka T. (1999) Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol. Today* 20, 141–151.

BRASIL. (2002a) Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. Manual Técnico para o Controle da Tuberculose, Brasília, DF.

BRASIL. (2002b) Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose – Uma proposta de integração ensino-serviço. 5. ed. Rio de Janeiro.

BRASIL. (2005) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde.

Brewer, T.F. (2000) Preventing tuberculosis with Bacillus Calmette Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis.* 31:64–7.

Britton, J.W. and Palendira, U. (2003) Improving vaccines against tuberculosis. *Immunology and cell Biology.* 50:34-35.

Bolotin, A.; Wincker, P.; Mauger, S.; Jaillon, O.; Malarne, K.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S. D.; Sorokin, A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 11:731–753.

Bowman, E. P. Kuklin, N.A.; Youngman, K.R.; Lazarus, N.H.; Kunkel, E.J.; Pan, J.; Greenberg, H.B.; Butcher, E.C. (2002) The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells. *J. Exp. Med.* 195, 269–275.

Brandt, L.; Oettinger, T.; Holm, A.; Andersen, A.B.; Andersen, P. (1996) Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 157, 3527–3533.

Brock, I., M. E. Munk, A. Kok-Jensen, and P. Andersen. (2001) Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5:462–467.

Brodin, P.; Eiglmeier, K.; Marmiesse, M.; Billault, A.; Garnier, T.; Niemann, S.; Cole, S. T. ; Brosch, R. (2002) Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis identifies *Mycobacterium microti* as a natural ESAT-6 deletion mutant. *Infect. Immun.* 70, 5568–5578.

Brodin, P., I. Rosenkrands, P. Andersen, S. T. Cole, and R. Brosch. (2004) ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol.* 12:500–508.

Brown, G.D; Dave, J.A.; Gey van Pittius, N.C.; Stevens, L.; Ehlers, M.R.; Beyers, A.D. (2000). The mycosins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: a family of subtilisin-like serine proteases. *Gene* 254, 147–155

Brusasca, P.N.; Peters, R.L.; Motzel, S.,; Klein, H.J.; Gennaro, M.L. (2003) Antigen recognition by serum antibodies in non-human primates experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Comp. Med.* 53, 165–172.

Burgess, C.; O'Connell-Motherway, M.; Sybesma, W.; Hugenholtz, J.; van Sinderen D. (2004) Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for in situ production of vitamin-enriched foods. *Appl Environ Microbiol* 70:5769–5777.

Butcher, E. C.; Williams, M.; Youngman, K.; Rott, L.; Briskin, M. (1999) Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv. Immunol.* 72, 209–253.

Camus, J.C. ; Pryor, M.J. ; Médigue, C., Cole, S.T. (2002) Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology.* Oct;148(Pt 10):2967-73.

Campbell, D. J. and Butcher, E. C. (2002) Rapid acquisition of tissuespecific homing phenotypes by CD4+ T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 195, 135–141.

Canaday, D.H.; Wilkinson, R.J.; LI, Q.; Harding, C.V.; Silver, R.F.; Boom, W.H. (2001) CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand independent mechanism. *J Immunol.* Vol. 1;167(5), p. 27342742.

Capone, S.; Zampaglione, I.; Vitelli, A.; Pezzanera, M.; Kierstead, L.; Burns, J.; Ruggeri, L.; Arcuri, M.; Cappelletti, M.; Meola, A.; Ercole, B.B.; Tafi, R.; Santini, C.; Luzzago, A.; Fu, T.M.; Colloca, S.; Ciliberto, G.; Cortese, R.; Nicosia, A.; Fattori, E.; Folgori, A. (2006) Modulation of the immune response induced by gene electrotransfer of a hepatitis C virus DNA vaccine in nonhuman primates. *J Immunol;* 177:7462-71.

Carpenter, Z.K.; Williamson, E.D.; Eyles, J.E. (2005) Mucosal delivery of microparticle encapsulated ESAT-6 induces robust cell-mediated responses in the lung milieu *Journal of Controlled Release* 104, 67–77

Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol.* 28:281-370.

Cattamanichi, A.; Posavad, C.M.; Wald, A.; Baine, Y.; Moses, J.; Higgins, T.J.; Ginsberg, R.; Ciccarelli, R.; Corey, L.; Koelle, D.M. (2008) Phase I study of a herpes simplex virus type 2 (HSV-2) DNA vaccine administered to healthy, HSV-2-seronegative adults by a needle-free injection system. *Clin Vaccine Immunol*; 15:1638-43.

Cervantes-Villagrana, A.R.; Hernández-Pando, R.; Biragyn, A.; Castañeda-Delgado, J.; Bodogai, M.; Martínez-Fierro, M.; Sada, E.; Trujillo, V.; Enciso-Moreno, A.; Rivas-Santiago, B. (2013) Prime-boost BCG vaccination with DNA vaccines based in β -defensin-2 and mycobacterial antigens ESAT6 or Ag85B improve protection in a tuberculosis experimental model. *Vaccine.* 11;31(4):676-84.

Chang-hong, S.; Xiao-wu, W.; Hai, Z.; Ting-fen, Z.; Li-mei, W.; Zhi-kai, X. (2008) Immune Responses and Protective Efficacy of the Gene Vaccine Expressing Ag85B and ESAT6 Fusion Protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *DNA and Cell Biology* Volume 27, Number 4, Mary Ann Liebert, Inc. Pp. 199–207

Chatel, J.M.; Langella, P.; Adel-Patient, K.; Commissaire, J.; Wal, J.M.; Corthier, G. (2001). Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8(3):545-51.

Chatel, J.M.; Pothelune, I.; Ah-Leung, S.; Corthier, G; Wal, J.M.; Langella, P. (2008) In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Therapy*, 1–7.

Cherif, M.S.; Shuaibu, M.N.; Kurosaki, T.; Helegbe, G.K.; Kikuchi, M.; Yanagi, T.; Tsuboi, T.; Sasaki, H.; Hirayama, K. (2011) Immunogenicity of novel nanoparticle-coated MSP-1 C-terminus malaria DNA vaccine using different routes of administration. *Vaccine.* 2011 Nov 8;29(48):9038-50.

Chong, S.Y.; Egan, M.A.; Kutzler, M.A.; Megati, S.; Masood, A.; Roopchand, V.; Garcia-Hand, D.; Montefiori, D.C.; Quiroz, J.; Rosati, M., Schadeck, E.B.; Boyer, J.D.; Pavlakis, G.N.; Weiner, D.B.; Sidhu, M.; Eldridge, J.H.; Israel, Z.R. (2007) Comparative ability of plasmid IL-12 and IL-15 to enhance cellular and humoral

immune responses elicited by a SIVgag plasmid DNA vaccine and alter disease progression following SHIV(89.6P) challenge in rhesus macaques. *Vaccine*; 25:4967-82.

Chopin, A.; Chopin, M.C.; Moillo-Batt, A.; Langella, P. (1984) Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid*; 11: 260:263.

Choudhary, R. K., S.; Mukhopadhyay, P.; Chakhaiyar, N.; Sharma, K. J.; Murthy, V. M.; Katoch, and S. E. Hasnain. (2003) PPE antigen Rv2430c of *Mycobacterium tuberculosis* induces a strong B-cell response. *Infect. Immun.* 71:6338–6343.

Clay, H.; Volkman, H. E. & Ramakrishnan, L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity* 29, 283–294 (2008).

Cole, S.T. Brosch, R. ; Parkhill, J. ; Garnier, T. Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S.V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C.E.; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M.A.; Rajandream, M.A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J.E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544.

Cole, S. T. (2002) Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 148:2919–2928.

Cooper, A. M. (2009) Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 393–422.

Courvalin, P.; Goussard, S.; Grillot-Courvalin, C. (1995) Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C.R. Acad. Sci. III* 318, 1207–1212.

Cox, G.J.M.; Zamb, T.J.; Babiuk, L.A. (1993) Bovine herpesvirus 1: immune response in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol*; 67:5664–7.

Dale, C.J.; Thomson, S.; De Rose, R.; Ranasinghe, C.; Medveczky, C.J.; Pamungkas, J.; Boyle, D.B.; Ramshaw, I.A.; Kent, S.J. (2006) Prime-boost strategies in DNA vaccines. *Methods Mol Med*; 127:171-97.

Dannenber, A.M. (1989). Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infect Dis.* 2:S369-78

Davis, J. and Ramakrishnan, L. (2009) The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* 136, 37–49.

Daudel, D.; Weidinger, G.; Spreng, S. (2007). Use of attenuated bacteria as delivery vectors for DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines.*6: 97-110.

De Azevedo, M.; Karczewski, J.; Lefèvre, F.; Azevedo, V.; Miyoshi, A.; Wells, J.M.; Langella, P.; Chatel, J.M. (2012) In vitro and in vivo characterization of DNA delivery using recombinant *Lactococcus lactis* expressing a mutated form of *L. monocytogenes* Internalin A. *BMC Microb* 12:299

De Vos, W.M. and Gasson, M.J. (1989) Structure and expression of the *Lactococcus lactis* gene for phospho-beta-galactosidase (lacG) in *Escherichia coli* and *L. lactis*. *J. Gen. Microbiol.*; 135: 1833-1846.

De Vos, W.M. (1999) Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*;2: 289-295.

De Vuyst, L. and Leroy, F. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13:194–199.

Dean, D.A. (1997) Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific, *Exp. Cell Res.* 230, 293–302

Dean, D.A.; Dean, B.S.; Muller, S.; Smith, L.C. (1999) Sequence requirements for plasmid nuclear entry, *Exp. Cell Res.* 253, 713–722.

Debard, N.; Sierro, F.; Browning, J.; Kraehenbuhl, J. P. (2001) Effect of mature lymphocytes and lymphotoxin on the development of the follicle-associated epithelium and M cells in mouse Peyer's patches. *Gastroenterology* 120, 1173–1182.

Del Carmen, S.; Zurita-Turk, M.; Lima, F. A.; Santos, J. S. C. dos; Leclecq, S. Y.; Chatel, J. M.; Azevedo, V.; Leblanc, A. de M. de; Miyoshi, A.; Leblanc, J. G. (2013) A novel interleukin-10 DNA mucosal delivery system attenuates intestinal inflammation in a mouse model. *European Journal of Inflammation.* Vol. 11, no. 2, p. 25-38.

Deplancke, B.; Gaskins, H. R. (2002) Redox control of the transsulfuration and glutathione biosynthesis pathways. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5:85–92.

Derrick, S. C. and Morris, S. L. (2007) The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression Cellular Microbiology 9(6), 1547–1555.

Devi, K. R., Kumar, K. S.; Ramalingam, B.; Alamelu R. (2002) Purification and characterization of three immunodominant proteins (38, 30, and 16 kDa) of *Mycobacterium tuberculosis*. Protein Expr. Purif. 24:188–195.

Dietrich, J.; Weldingh, K.; Andersen, P. (2006) Prospects for a novel vaccine against tuberculosis. Veterinary Microbiology 112, 163–169.

Dietrich, J.; Billeskov, R.; Doherty, T.M.; Andersen, P. (2007) Synergistic Effect of Bacillus Calmette Guerin and a Tuberculosis Subunit Vaccine in Cationic Liposomes: Increased Immunogenicity and Protection. J. Immunol.;178;3721-3730

Dieye, Y.; Usai, S.; Clier, F.; Gruss, A.; Piard, J.C. (2001) Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. J Bacteriol 183, 4157- 4166.

Dissel, J.T.V.; Arend, S.M.; Prins, C.; Bang, P.; Tingskov, P.N.; Lingnau, K.; Nouta, J.; Klein, M.R.; Rosenkrands, I. Ottenhoff, T.H.M.; Kromann, I.; Doherty, T.M.; Andersen, P. (2010) Ag85B–ESAT-6 adjuvanted with IC31® promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in naïve human volunteers. Vaccine 28, 3571–3581

Doffinger, R.; Jouanguy, E.; Dupuis, S.; Fondaneche, M.C.; Stephan, J.L.; Emile, J.F.; Lamhamedi-Cherradi, S.; Altare, F.; Pallier, A.; Barcenas-Morales, G.; Meinel, E.; Krause, C.; Pestka, S.; Schreiber, R.D.; Novelli, F.; Casanova, J.L. (2000) Partial interferon-gamma receptor signaling chain deficiency in a patient with bacille Calmette Guerin and *Mycobacterium abscessus* infection. J Infect Dis;181:379–84.

Dorella, F.A.; Pacheco, L.G.C.; Oliveira, S.C; Miyoshi, A.; Azevedo, V. (2006) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence, Vet. Res. 37:201–218.

Doria-Rose, N.A. and Haigwood, N.L. (2003) DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. Methods, 31:207-216.

Dou, J.; Wang, Y.; Yu, F.; Yang, H.; Wang, J.; He, X.; Xu, W.; Chen, J.; Hu, K. (2012) Protection against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice by DNA vaccine Ag85A-ESAT-6-IL-21 priming and BCG boosting. International Journal of Immunogenetics, 39, 183–190

Dunham, S.P. (2002) The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Res Vet Sci.*73: 9–16.

Duwat, P.; Cesselin, B.; Sourice, S.; Gruss, A. (2000) *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. *Int. J. Food Microbiol.*; 55: 83-86.

Dye, C.; Scheele, S.; Dolin, P.; Pathania, V.; Raviglione, M. (1999) Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* 282: 677–686.

Dye, C. (2006) Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet*; 367: 938-40.

Edwards, L. B.; Acquaviva, F. A.; Livesay, V. T.; Cross, F. W.; Palmer, C. E. (1969) An atlas of sensitivity to tuberculin, PPD-B, and histoplasmin in the United States. *Am. Rev. Respir. Dis.* 99:1–132.

Elhay, M.J.; Oettinger, T.; Andersen, P. (1998) Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. *Infect. Immun.* 66, 3454–3456.

Ernst, J. D. (2012) The Immunological life cycle of tuberculosis. *Nature Reviews, Immunology*, volume 12, 581-591.

Fagarasan, S. and Honjo, T. (2003) Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature Rev. Immunol.* **3**, 63–72.

Fan, X.; Gao, Q.; Fu, R. (2007) DNA vaccine encoding ESAT-6 enhances the protective efficacy of BCG against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Scand J Immunol.* Nov; 66(5):523-8. Epub 2007 Oct 3.

Fasbender, A.; Zabner, J.; Zeiher, B.G.; Welsh, M.J. (1997) A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia, *Gene Ther.* 4, 1173–1180

Feng, G.; Jiang, Q.; Xia, M.; Lu, Y.; Qiu, W.; Zhao, D.; Lu, L.; Peng, G.; Wang, Y. (2013) Enhanced immune response and protective effects of nano-chitosan-based DNA vaccine encoding T cell epitopes of Esat-6 and FL against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS One.* 23;8(4):e61135.

Ferrari, G., Langen, H., Naito, M.; Pieters, J. (1999) A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97, 435–447.

Ferrera, F.; La Cava, A.; Rizzi, M.; Hahn, B.H.; Indiveri, F.; Filaci, G. (2007) Gene vaccination for the induction of immune tolerance. *Ann N Y Acad Sci*; 1110:99-111.

Flynn, J.L. (2004) Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)*; 84: 93-101.

Frieden, T.R.; Sterling, T.R.; Munsiff, S.S.; Watt, C.J.; Dye, C. (2003) Tuberculosis. *Lancet* 362: 887–899.

Fuller, D.H.; Loudon, P.; Schmaljohn, C. (2006) Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods*; 40:86-97.

Furness, J.B.; Kunze, W.A.; Clerc, N. (1999) Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am. J. Physiol.* 277, G922–G928.

Gaillard, J.L.; Berche, P.; Frehel, C.; Gouin, E.; Cossart, P. (1991) Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci, *Cell* 65 1127–1141.

Gandhi, N.R.; Moll, A.; Sturm, A.W.; Pawinski, R.; Govender, T.; Lalloo, U.; Zeller, K.; Andrews, J.; Friedland, G. (2006) Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet*. Nov 4;368(9547):1575-80.

Gao, L.Y.; Guo, S.; McLaughlin, B.; Morisaki, H.; Engel, J.N.; Brown, E.J. (2004) A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol Microbiol*, 53(6):1677-1693.

Gao, H.; Yue, Y.; Hu, L.; Xu, W.; Xiong, S. (2009a) A novel DNA vaccine containing multiple TB-specific epitopes casted in a natural structure (ECANS) confers protective immunity against pulmonary mycobacterial challenge. *Vaccine* 27, 5313–5319

Gao, H.; Li, K.; Yu, S.; Xiong, S.A. (2009b) novel DNA vaccine containing multiple TB-specific epitopes cast in a natural structure elicits enhanced Th1 immunity compared with BCG. *Microbiol Immunol*; 53: 541–549

Gasson, M.J. (1983a) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic acid streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154, 1–9.

Gasson, M.J. (1983b) Genetic transfer systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 49(3):275-82.

Gey van Pittius, N.C.; Gamielien, J.; Hide, W.; Brown, G.D.; Siezen, R.J.; Beyers, A.D. (2001) The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram positive bacteria. *Genome Biol*; 2 (10):1–18.

Ginsberg, A.M. (2002) What's new in tuberculosis vaccines? *Bull World Health Organ.* 80(6):483-488.

Gordon, S.V.; Brosch, R.; Billault, A.; Garnier, T.; Eiglmeier, K.; Cole, S.T. (1999) Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.* 32, 643–656.

Guimarães, V.D.; Gabriel, J.E.; Lefèvre, F.; Cabanes, D.; Gruss, A.; Cossart, P.; Azevedo, V.; Langella, P. (2005) Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes and Infection.* 7:836–844.

Guimarães, V.D.; Innocentin, S.; Lefèvre, F.; Azevedo, V.; Wal, J.M.; Langella, P.; Chatel, J.M. (2006) Use of Native Lactococci as Vehicles for Delivery of DNA into Mammalian Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, Nov., p. 7091–7097

Guimarães, V.; Innocentin, S.; Chatel, J.M.; Lefevre, Langella.; Azevedo, V.; Miyoshi, A. (2009) A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genetic Vaccines and Therapy.* 7:4:1-24

Grillot-Courvalin, C.; Goussard, S.; Courvalin, P. (1999) Bacteria as gene delivery vectors for mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol* 1999.10: 477–481.

Gurski, J. and Baker, K.C. (2008). An unusual presentation: renal tuberculosis. *Scientific World Journal.* 23;8:1254-5

Gurunathan, S.; Wu, C.Y.; Freidag, B.L.; Seder, R.A. (2000) DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol.* 12(4):442-7

Guy-Grand, D.; Vassalli, P. (1993) Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* Apr, 5(2):247-252.

Hall, L.J.; Clare, S.; Pickard, D.; Clark, S.O.; Kelly, D.L.F.; Ghany, M.A.E.; Hale, C.; Dietrich, J.; Andersen, P.; Marsh, P.D.; Dougan, G. (2009) Characterisation of a live *Salmonella* vaccine stably expressing the *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B–ESAT6 fusion protein. *Vaccine.* November 16; 27(49): 6894–6904.

Hamada, H.; Hiroi, T.; Nishiyama, Y.; Takahashi, H.; Masunaga, Y.; Hachimura, S.; Kaminogawa, S.; Takahashi-Iwanaga, H.; Iwanaga, T.; Kiyono, H.; Yamamoto, H.; Ishikawa, H. *J* (2002) Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *Immunol.* Jan 1;168(1):57-64.

Hanniffy, S.B.; Carter, A.T.; Hitchin, E.; Wells, J.M. (2007) Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. *J Infect Dis* 195(2):185-93.

Harboe, M. (1981) Antigens of PPD, old tuberculin, and autoclaved *Mycobacterium bovis* BCG studied by crossed immunoelectrophoresis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 124:80-87.

Harboe, M.; Oettinger, T.; Wiker, H.G.; Rosenkrands, I.; Andersen, P. (1996) Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 64, 16–22.

Harris, J. and Keane, J. (2010) How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 161, 1–9.

Harth, G. and Horwitz, M. A. (1999) An inhibitor of exported *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase selectively blocks the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes: extracellular proteins as potential novel drug targets. *J. Exp. Med.* 189, 1425–1435.

Hijjar, M.A.; Gerhardt, G.; Teixeira, G.M.; Procópio, M.J. (2007) Retrospect of tuberculosis control in Brazil. *Rev Saúde Pública.* 41:1-9.

Hoebe, K.; Janssen, E.; Beutler, B. (2004) The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* Oct;5 (10):971-4.

Hoft, D. (2008). Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet.* 372:164-75

Holmgren J.; Czerkinsky C. (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11: S45–S53

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A. Staley, J.T.; Williams, S.T. (1994) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins. 31:754-760.

Hooper, L. V. e Macpherson, A. J. (2010) Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, 10:159–169.

Horwitz, M.A.; Lee, B.W., Dillon, B.J., Harth, G. (1995) Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1530–1534.

Hsu, T.; Hingley-Wilson, S. M.; Chen, B.; Chen, M.; Dai, A. Z. ; Morin, P. M.; Marks, C. B.; Padiyar, J.; Goulding, C.; Gingery, M.; Eisenberg, D.; Russell, R. G.; Derrick, S. C.; Collins, F. M.; Morris, S. L.; King, C. H.; Jacobs, W. R. Jr. (2003) The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (21):12420–12425.

Houghton, R.L.; Lodes, M.J.; Dillon, D. C.; Reynolds, L.D.; Day, C.H.; McNeill, P. D.; Hendrickson, R.C.; Skeiky, Y.A., Sampaio, D.P.; Badaro, R., Lyashchenko, K.P.; Reed, S.G. (2002) Use of multiepitope polyproteins inserodiagnosis of active tuberculosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9:883–891.

Hu, W.S. and Pathak, V.K. (2000) Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol. Rev.* 52, 493–511.

Huebner, R.E., Schein, M. F.; Bass, Jr. J. B.; Huebner, R. E.; Schein, M. F.; Bass, Jr. J. B. (1993) The tuberculin skin test. *Clin. Infect. Dis.* 17:968–975.

Hughenoltz, J.; Sybesma, W.; Groot, M.N.; Wisselink, W.; Ladero, V.; Burgess, K.; van Sinderen, D.; Piard, J.C.; Eggink, G.; Smid, E.J.; Savoy, G.; Sesma, F.; Jansen, T.; Hols, P.; Kleerebezem, M. (2002) Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek* Aug; 82 (1-4):217-35.

Hutchings, A. B.; Helander, A.; Silvey, K. J.; Lucas, W. T.; Neutra, M. R. (2004) Secretory IgA antibodies against the sigma1 outer capsid protein of reovirus type 1 Lang prevent infection of mouse Peyer's patches. *J. Virol.* 78, 947–957.

Ingolotti, M.; Kawalekar, O.; Shedlock, D.J.; Muthumani, K.; Weiner, D.B. (2010) DNA vaccines for targeting bacterial infections. *Expert Rev Vaccines*. Jul; 9(7):747-63.

Innocentin, S.; Guimarães, V.; Myoshi, A.; Azevedo, V.; Langella, P.; Chatel, J-M; Lefèvre, F. (2009) *Lactococcus lactis* Expressing either *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Protein A or *Listeria monocytogenes* Internalin A Can Efficiently Internalize and Deliver DNA in Human Epithelial Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (14): 4870-4878

International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD). (1994) Criteria for discontinuation of vaccination programmes using Bacille Calmette-Guerin (BCG) in countries with a low prevalence of tuberculosis. *Tuberc Lung Dis*; 75: 179-80.

Izapanah, A.; Dwinell, M. B.; Eckmann, L.; Varki, N. M.; Kagnoff, M. F. (2001) Regulated MIP-3 α /CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.* 280, G710–G719.

Izzo, A.; Brandt, L.; Lasco, T.; Kipnis, A.P.; Orme, I.M. (2005) NIH pre-clinical screening program: overview and current status. *Tuberculosis*; 85:25–8.

Jana, S. and Deb, J.K. (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 67: 289–298.

Jiang, Q.; Zhang, J.; Chen, X.; Xia, M.; Lu, Y.; Qiu, W.; Feng, G.; Zhao, D.; Li, Y.; He, F.; Peng, G.; Wang, Y. (2013) A novel recombinant DNA vaccine encoding *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and FL protects against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice. *J Biomed Res.* Sep;27(5):406-20.

Kamath, A.T.; Feng, C.G.; Macdonald, M.; Briscoe, H.; Britton, W.J. (1999) Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*; 67:1702–7.

Kamath, A.T.; Rochat, A.F. ; Valenti, M.P. ; Agger, E.M.; Lingnau, K.; Andersen, P.; Lambert, P.H.; Siegrist, C.A. (2008) Adult-Like Anti-Mycobacterial T Cell and In Vivo Dendritic Cell Responses Following Neonatal Immunization with Ag85B-ESAT-6 in the IC31H Adjuvant. *Plos One.* 3:1-10

Kanazawa, T.; Takashima, Y.; Hirayama, S.; Okada, H. (2008) Effects of menstrual cycle on gene transfection through mouse vagina for DNA vaccine *International Journal of Pharmaceutics* 360 164–170.

Kang, D. D., Lin, Y., Moreno, J. R., Randall, T. D. & Khader, S. A. Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. *Plos One* 6, e16161 (2011).

Kapikian A. Z. Hoshino, Y.; Chanock, R.M.; Pérez-Schael, I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J. Infect. Dis.* 174, S65–S72 (1996).

Kaufmann, S.H.E. (1999) in *Fundamental Immunology* 4th edn (ed. Paul, W.) 1335–1371 (Lippincott–Raven, New York).

Kaufmann S.H.E. (2000) Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med*; 6:955–60

Kaufmann S.H.E. (2001) How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature reviews, Immunology*. Volume 1 - October, 20-30p.

Kaufmann, S.H.E. (2002) Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis*. Vol. 61(II), p. ii54ii58.

Kaufmann, S.H.E. (2004) New issues in tuberculosis. *Ann Rheum Dis*. Vol. 63(II), p. ii50–ii56.

Kent, S.; De Rose, R.; Rollman, E. (2007) Drug evaluation: DNA/MVA prime-boost HIV vaccine. *Curr Opin Investig Drugs*; 8:159-67.

Klaenhammer, T.R.; Barrangou, R.; Buck, B.L.; Azcarate-Peril, M.A.; Altermann, E. (2005) Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev*. Aug;29(3):393-409.

Kumagai, Y.; Takeuchi, O.; Akira, S. (2008) TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev*; 60:795-804.

Kunkel, E.J. and Butcher, E.C. (2003) Plasma-cell homing. *Nature Rev. Immunol.* 3, 822–829.

Kutzler, M.A. and Weiner, D.B. (2008) DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics*; 9:776–88.

Kwon, S.; Yoo, I.K.; Lee, W.G.; Chang, H.N.; Chang, Y.K. (2001) High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell recycle bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 73:25–34.

Lagranderie, M.R.; Balazuc, A.M.; Deriaud, E.; Leclerc, C.D.; Gheorghiu, M. (1996) Comparison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *Infect Immun.* Jan;64(1):1-9.

Lalvani, A.; Pathan, A.A.; McShane, H.; Wilkinson, R.J.; Latif, M.; Conlon, C.P.; Pasvol, G.; Hill, A.V. (2001a) Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 824–828.

Lalvani, A.; Pathan, A.A.; Durkan, H.; Wilkinson, K.A.; Whelan, A.; Deeks, J.J.; Reece, W.H.; Latif, M.; Pasvol, G.; Hill, A.V. (2001b) Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 357, 2017–2021.

Le, T.P.; Coonan, K.M.; Hedstrom, R.C.; Charoenvit, Y.; Sedegah, M.; Epstein, J.E.; Kumar, S.; Wang, R.; Doolan, D.L.; Maguire, J.D.; Parker, S.E.; Hobart, P.; Norman, J.; Hoffman, S.L. (2000) Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine.* Mar 17;18 (18):1893-901.

Le Loir, Y.; Nouaille, S.; Commissaire, J.; Bretigny, L.; Gruss, A.; Langella, P. (2001) Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 67, 4119-4127.

Le Loir, Y.; Azevedo, V.; Oliveira, S.C.; Freitas, D.A.; Miyoshi, A.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Nouaille, S.; Ribeiro, L.A.; Leclercq, S.; Gabriel, J.E.; Guimaraes, V.D.; Oliveira, M.N.; Charlier, C.; Gautier, M. and Langella, P. (2005) Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb Cell Fact* 4, 2.

LeBlanc, J., LeBlanc, A., Perdígón, G., Miyoshi, A., Rochat, T., Bermúdez-Humarán, L., Langella, P., Sesma, F., Azevedo, V. (2008) Anti-inflammatory Properties of Lactic Acid Bacteria: Current Knowledge, Applications and Prospects. *Anti-Infective Agents in Medical Chemistry*, 7, 148-154.

Lebrun, M.; Mengaud, J.; Ohayon, H.; Nato, F.; Cossart, P. (1996) Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells, *Mol. Microbiol.* 21, 579–592.

Lechardeur, D.; Sohn, K.J.; Haardt, M.; Joshi, P.B.; Monck, M.; Graham, R.W.; Beatty, B.; Squire, J.; O'Brodovich, H.; Lukacs, G.L. (1999) Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer, *Gene Ther.* 6, 482–497.

Lecuit, M.; Vandormael-Pournin, S.; Lefort, J.; Huerre, M.; Gounon, P.; Dupuy, C.; Babinet, C.; Cossart, P. (2001) A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292:1722-5.

Levine, M.M. (2000) Immunization against bacterial diseases of the intestine. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 31, 336–355.

Lefrançois, L.; Olson, S.; Masopust, D. (1999) A critical role for CD40–CD40 ligand interactions in amplification of the mucosal CD8 T cell response. *J. Exp. Med.* 190, 1275–1283.

Li, Z.; Howard, A.; Kelley, C.; Delogu, G.; Collins, F.; Morris, S. (1999) Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. *Infect. Immun.* 67, 4780–4786.

Li, J.M. and Zhu, D.Y. (2006) Therapeutic DNA vaccines against tuberculosis: a promising but arduous task. *Chin Med J (Engl)*; 119:1103-7.

Li, K.B.; Zhang, X.G.; Ma, J.; Jia, X.J.; Wang, M.; Dong, J.; Zhang, X.M.; Xu, H.; Shu, Y.L. (2008) Codon optimization of the H5N1 influenza virus HA gene gets high expression in mammalian cells. *Bing Du Xue Bao*; 24:101-5.

Lillebaek, T. Dirksen, A.; Vynnycky, E.; Baess, I.; Thomsen, VØ.; Andersen, A.B. (2003) Stability of DNA patterns and evidence of *Mycobacterium tuberculosis* reactivation occurring decades after the initial infection. *J. Infect. Dis.* 188, 1032–1039.

Lin, Y.G.; Zhang, M.; Hofman, F.M.; Gong, J.H.; Barnes, P. F. (1996) Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect. Immun.* 64, 1351–1356.

Liu, M.A. and Ulmer, J.B. (2005) Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv. Genet.* 55, 25–40.

Liu, L.; Tran, V.; Leung, A.S.; Alexander, D.C.; Zhu, B. (2009) BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines.* 5:2 70-78.

Ljungqvist, L.; Andersen, A. B.; Andersen, P.; Hasløv, K.; Worsaae, A.; Bennedsen, J.; Heron, I. (1990) Affinity purification, biological characterization and serological evaluation of defined antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *Trop. Med. Parasitol.* 41:333–335.

Lowrie, D.B.; Silva, C.L.; Ragno, C.S.; Tascon, R.E. (1997) Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine*;15 (8):834-838.

Lu, J.; Wang, C.; Zhou, Z.; Ying Zhang, Cao, T.; Shi, C.; Chen, Z.; Chen, L.; Cai, C. and Fan, X. (2011) Immunogenicity and Protective Efficacy against Murine Tuberculosis of a Prime-Boost Regimen with BCG and a DNA Vaccine Expressing ESAT-6 and Ag85A Fusion Protein. *Clinical and Developmental Immunology*. Article ID 617892, 10 pages doi:10.1155/2011/617892

Lugo, M.T.G. and Bewley, C.A. (2008) Natural Products, Small Molecules, and Genetics in Tuberculosis Drug Development. *J. Med. Chem.* 51:2606-2612.

Lugosi, L. (1992) Theoretical and Methodological Aspects of BCG Vaccine from the Discovery of Calmette and Guerin to Molecular Biology - A Review. *Tubercle and Lung Disease*. 73, 252-261.

Lyashchenko, K.; Colangeli, R.; Houde, M.; Al Jahdali, H.; Menzies, D.; Gennaro, M.L. (1998a) Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect. Immun.* 66, 3936–3940.

Lyashchenko, K.P.; Pollock, J.M.; Colangeli, R.; Gennaro, M.L. (1998b) Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 66, 5344–5349

Macfarlane, G.T. and Cummings, J.H. (2002) Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis* 15:501–506

MacPherson, G.G. and Liu, L.M. (1999) Dendritic cells and Langerhans cells in the uptake of mucosal antigens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 236, 33–53.

Mahairas, G.G.; Sabo, P.J.; Hickey, M.J.; Singh, D.C.; Stover, C.K. (1996) Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of Bacteriology*. 178, 1274-1282.

Makarova, K.S. and Koonin, E.V. (2007) Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J Bacteriol* 189: 1199–1208.

Mayer, L. and Shao L. (2004) Therapeutic potential of oral tolerance. *Nature Rev. Immunol.* 4, 407–419.

McIntyre, T.M. and Strober, W. (1999) in *Mucosal Immunology*, 2nd edition (eds Ogra, P. L. *et al.*) 319–356 (Academic Press, San Diego).

McShane, H. (2005) Co-infection with HIV and TB: double trouble. *Int J STD AIDS* 16: 95–101.

Mercenier, A.; Muller-Alouf, H.; Grangette, C. (2000) Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2(1): 17-25.

Mestecky, J. (1987) The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol.* 7, 265–276.

Mestecky, J.; Moro, I.; Kerr, M. A.; Woof, J. M. (2005) in *Mucosal Immunology*, 3rd edn (eds Ogra, P.L. *et al.*) 153–182 (Academic Press, San Diego).

Miller, A.M. and Dean, D.A. (2009) Tissue-specific and transcription factor-mediated nuclear entry of DNA. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 603–613

Miller, J. L.; Velmurugan, K.; Cowan, M. J.; Briken, V. (2010) The type I NADH dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF- α -mediated host cell apoptosis. *PLoS Pathog.* 6, e1000864.

Mills, S.; McAuliffe, O.E.; Coffey, A.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P. (2006) Plasmids of lactococci - genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiol Rev* 30(2):243-73.

Milstien, J.B. and Gibson, J.J. (1989) Quality control of BCG vaccines by the World Health Organization: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. Geneva, World Health Organization.

Mincheff, M.; Tchakarov, S.; Zoubak, S.; Loukinov, D.; Botev, C.; Altankova, I.; Georgiev, G.; Petrov, S.; Meryman, H.T. (2000) Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a Phase I/II clinical trial. *Eur. Urol.* Aug;38(2):208-17.

Minnikin, D.E.; Parlett, J.H.; Magnusson, M.; Ridell, M.; Lind, A. (1984) Mycolic acid patterns of representatives of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol.* Oct;130(10):2733-6.

Miyoshi, A.; Jamet, E.; Commissaire, J.; Renault, P.; Langella, P.; Azevedo, V. (2004) A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol Lett. 239(2):205-12.

Miyoshi, A.; Bermudez-Humaran, L.; Pacheco de Azevedo, M.; Langella, P.; Azevedo, V. (2010) "Lactic acid bacteria as live vectors: heterologous protein production and delivery systems," in *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, F. Mozzi, R. Raya, and G. Vignolo, Eds., p. 9, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.

Modlin, J. F. (2004) Poliomyelitis in the United States: the final chapter? *JAMA* 292, 1749–1751.

Moore, A.C. and Hill, A.V. (2004) Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria. *Immunol Rev*; 199:126-43.

Moorthy, V.S.; Pinder, M.; Reece, W.H.; Watkins, K.; Atabani, S.; Hannan, C.; Bojang, K.; McAdam, K.P.; Schneider, J.; Gilbert, S.; Hill, A.V. (2003) Safety and immunogenicity of DNA/modified vaccinia virus Ankara malaria vaccination in African adults. *J. Infect. Dis.* 188, 1239–1244.

Mora, J. R.; Bono, M.R.; Manjunath, N.; Weninger, W.; Cavanagh, L.L.; Roseblatt, M.; Von Andrian, U.H. (2003) Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 424, 88–93.

Morello, E.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Llull, D.; Solé, V.; Miraglio, N.; Langella, P.; Poquet, I. (2008) *Lactococcus lactis*, an Efficient Cell Factory for Recombinant Protein Production and Secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol*;14:48–58.

Mori, T.; Sakatani, M.; Yamagishi, F.; Takashima, T.; Kawabe, Y.; Nagao, K.; Shigeto, E.; Harada, N.; Mitarai, S.; Okada, M.; Suzuki, K.; Inoue, Y.; Tsuyuguchi, K.; Sasaki, Y.; Mazurek, G.H.; Tsuyuguchi, I. (2004) Specific detection of tuberculosis infection with an interferon-gamma based assay using new antigens. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 59–64.

Mowat, A. M. (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews, Immunology*. Volume 3, April, 331-341.

Murphy, G.D.; Rydman, R.R.; Batesky, D.; Hill, S. (1995) Clinical parameters that predict culture-positive pulmonary tuberculosis in the emergency department. *Ann. Emerg. Med.* 25:137.

Mustafa, A.S.; Oftung, F.; Amoudy, H.A.; Madi, N.M.; Abal, A.T.; Shaban, F.; Rosenkrands, I.; Andersen, P. (2000) Multiple epitopes from the Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 antigen are recognized by antigen-specific human T cell lines. *Clin. Infect. Dis.* 30(Suppl 3), S201–S205.

Mustafa, A.S. (2002) Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Mol. Immunol.* 39:113–119.

Mustafa, A.S.; Shaban, F.A.; Al-Attayah, R.; Abal, A.T.; El-Shamy, A.M.; Andersen, P.; Oftung, F. (2003) Human Th1 cell lines recognize the Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 antigen and its peptides in association with frequently expressed HLA class II molecules. *Scand. J. Immunol.* 57, 125–134.

Muthumani, K.; Lankaraman, K.M.; Laddy, D.J.; Sundaram, S.G.; Chung, C.W.; Sako, E.; Wu, L.; Khan, A.; Sardesai, N.; Kim, J.J.; Vijayachari, P.; Weiner, D.B. (2008) Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine*; 26:5128-34.

Neutra, M.R. and Kraehenbuhl J.P. (2005) in *Mucosal Immunology* 3rd edn (eds Ogra, P. L. *et al.*) 111–130 (Academic Press, San Diego).

Neutra, M.R. and Kozlowski, P.A. (2006) Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature Reviews, Immunology*. February, volume 6, 148-158.

Nicod, L.P. (2007) Immunology of tuberculosis. *Swiss Med Wkly.* vol. 137, p. 357362.

Niess, J. H.; Brand, S.; Gu, X.; Landsman, L.; Jung, S.; McCormick, B.A.; Vyas, J.M.; Boes, M.; Ploegh, H.L.; Fox, J.G.; Littman, D.R.; Reinecker, H.C. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254–258 (2005).

Norton, P.M.; Le Page, R.W.; Wells, J.M. (1995) Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiol.* 40(3):225-30.

Nouaille S.; Ribeiro, L.A.; Miyoshi, A.; Pontes, D.; Le Loir, Y.; Oliveira, S.C.; Langella, P.; Azevedo, V. (2003) Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res.* 31;2(1):102-11.

Okkels, L.M.; Brock, I.; Follmann, F.; Agger, E. M.; Arend, S. M.; Ottenhoff, T. H.; Oftung, F.; Rosenkrands, I.; Andersen, P. (2003) PPE protein (Rv3873) from DNA

segment RD1 of *Mycobacterium tuberculosis*: strong recognition of both specific T-cell epitopes and epitopes conserved within the PPE family. *Infect. Immun.* 71:6116–6123.

Olsen, A.W.; Van Pinxteren, L.A.H.; Okkels, L.M.; Peter Birk Rasmussen, P.B.; Andersen, P. (2001) Protection of Mice with a Tuberculosis Subunit Vaccine Based on a Fusion Protein of Antigen 85B and ESAT-6. *Infection and Immunity*, May, p. 2773–2778.

Olsen A.W.; Williams, A.; Okets I.M.; Hatch, G.; Andersen, A. (2004). Protective effect of a subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT- 6 in the aerosol guinea pig model. *Infect Immun.* 72:6146–50

Orme, I.M.; Andersen, P.; Boom, W.H. (1993) T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 167, 1481–1497.

Orme, I.M. (2005) Mouse and guinea pig models for testing new tuberculosis vaccines. *Tuberculosis*; 85(1–2):13–7.

Paglia, P.; Medina, E.; Arioli, I.; Guzman, C.A.; Colombo, M.P. (1998) Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* 92, 3172–3176.

Palomino, J. C.; Leão, S. C.; Ritacco, V. (2007) Tuberculosis. From basic science to patient care (www.TuberculosisTextbook.com).

Pan, Z.; Zhang, X.; Geng, S.; Cheng, N.; Sun, L.; Liu, B.; Huang, J.; Jiao, X. (2009) Priming with a DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* and boosting with a killed vaccine confers protection of chickens against infection with the H9 subtype of avian influenza virus. *Vaccine*; 27:1018-23.

Patterson, L.J.; Robert-Guroff, M. (2008) Replicating adenovirus vector prime/protein boost strategies for HIV vaccine development. *Expert Opin Biol Ther*; 8:1347-63.

Pereira, V.B. (2011) Construção e avaliação funcional de um plasmídeo vacinal para a expressão do antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* em células mamíferas, utilizando uma bactéria láctica invasiva como veículo carreador. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 124p.

Perkins, M. D. (2000) New diagnostic tools for tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4:S182–S188.

Pfyffer, G.E.; Auckenthaler, R.; Embden, J. D. A.; Soolingen, D. (1998) *Mycobacterium canetti*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg Infect Dis.* 4(4): 631-4.

Piard, J.C.; Hautefort, I.; Fischetti, V.A.; Ehrlich, S.D.; Fons, M. and Gruss A. (1997) Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol* 179, 3068-3072.

Pieters, J. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell & Microbe Review.* 3:399-407.

Pollock, J.M. and Andersen, P. (1997) Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect. Immun.* 65, 2587–2592.

Pollock, J.M.; McNair, J. Bassett, H.; Cassidy, J.P.; Costello, E.; Aggerbeck, H.; Rosenkrands, I.; Andersen, P. (2003) Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1856–1860.

Pontes D.S.; de Azevedo M.S.; Chatel J.M.; Langella P.; Azevedo V.; Miyoshi A. (2011) *Lactococcus lactis* as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expr Purif.*, 79(2):165–75.

Pontes, D.; Innocentin, S.; Del Carmen, S.; Almeida, J.F.; Leblanc, J.G.; de Moreno de Leblanc, A.; Blugeon, S.; Cherbuy, C.; Lefèvre, F.; Azevedo, V.; Miyoshi, A.; Langella, P.; Chatel, J.M. (2012) Production of Fibronectin Binding Protein A at the surface of *Lactococcus lactis* increases plasmid transfer in vitro and in vivo. *PLoS One*; 7(9):e44892.

Pontes D, Azevedo M, Innocentin S, Blugeon S, Lefèvre F, et al. (2014) Immune Response Elicited by DNA Vaccination Using *Lactococcus lactis* Modified by the Production of Surface Exposed Pathogenic Protein. *PLoS ONE* 9(1): e84509. doi:10.1371/journal.pone.0084509.

Poquet, I.; Ehrlich, S.D.; Gruss, A. (1998) An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 180:1904-1912.

Pottumarthy S.; Morris A.J.; Harrison A.C.; Wells V.C. (1999) Evaluation of the tuberculin gamma interferon assay: potential to replace the Mantoux skin test. *J Clin Microbiol*; 37:3229-32.

Pym, A.S.; Brodin, P.; Brosch, R.; Huerre, M.; Cole, S.T. (2002) Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 46: 709–717.

Pym, A.S., Brodin, P. ; Majlessi, L.; Brosch, R.; Demangel, C.; Williams, A.; Griffiths, K.E.; Marchal, G.; Leclerc, C.; Cole, S. T. (2003). Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat. Med.* 9:533–539.

Que, Y.A.; Francois, P. ; Haefliger, J.A. ; Entenza, J.M. ; Vaudaux, P.; Moreillon, P. (2001) Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun* 69:6296-302.

Ramakrishnan, L. (2012) Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews, Immunology*. May, Volume 12. 352-366.

Ravn, P.; Demissie, A.; Egualé, T.; Wondwosson, H.; Lein, D.; Amoudy, H.A.; Mustafa, A.S.; Jensen, A.K.; Holm, A.; Rosenkrands, I.; Oftung, F.; Olobo, J.; von Reyn, F.; Andersen, P. (1999) Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 179, 637–645

Ravn, P.; Arnau, J.; Madsen, S.M.; Vrang, A.; Israelsen, H. (2000) The development of TnNuc and its use for the isolation of novel secretion signals in *Lactococcus lactis*. *Gene*, 242:347-356.

Reid, G.; Jass, J.; Sebulsky, M.T.; McCormick, J.K. (2003) Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 16: 658–672.

Reed, S. and Lobet, Y. (2005) Tuberculosis Vaccine Development: From Mouse To Man. *Microbes And Infect.* 7:922-931.

Renshaw, P.S.; Panagiotidou, P.; Whelan, A.; Gordon, S.V.; Hewinson, R.G.; Williamson, R.A.; Carr, M.D. (2002) Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the M. tuberculosis complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterisation of the structural properties of ESAT-6, CFP-10 and the ESAT-6-CFP-10 complex: implications for pathogenesis and virulence. *J. Biol. Chem.* 277(24), 21598–21603.

Rescigno, M.; Rotta, G.; Valzasina, B.; Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204, 572–581.

Reyes-Sandoval, A. and Ertl, H.C. (2001) DNA vaccines. *Curr Mol Med*; 1:217-43.

Robinson, K.; Chamberlain, L.M.; Schofield, K.M.; Wells, J.M.; Le Page, R.W. (1997) Oral Vaccination Of Mice Against Tetanus Using Recombinant *Lactococcus Lactis*. Nature Biotechnology. 15: 653-657

Rock, R.B.; Olin, M.; Baker, C.A.; Molitor, T.W.; Peterson, P.K. (2008) Central Nervous System Tuberculosis: Pathogenesis And Clinical Aspects. Clin. Microbiol. 21:243-256

Russell, D.G. (2007) Who puts the tubercle in tuberculosis? Nat Rev Microbiol.;5(1):39-47.

Ryan, E.J., Daly, L.M.; Mills, H.G. (2001) Immunoregulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. Trends Biotechnol. 19, 293–304.

Salgame, P. (2005) Host Innate and Th1 Responses and the Bacterial Factors that Control *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Curr Opin Immunol. 17(4):374-80.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y

Sanders, M.E. (2003) Probiotics: considerations for human health. Nutr Rev. Mar; 61(3):91-9. Review.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74:5463-5467.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M.; Lanzavecchia, A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature 401, 708–712.

Schaffner, W. (1980) Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2163–2167.

Schaible, U.E., Collins, H.L.; Kaufmann, S.H. (1999) Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. Adv. Immunol. 71, 267–377.

Schaible, U.E.; Sturgill-Koszycki, S.; Schlesinger, P.H.; Russell, D.G. (1998) Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. J. Immunol 160, 1290–1296.

Schleifer, K.H.; Kraus, J.; Dvorak, C.; Kilpper-Bälz, R.; Collins, M.D.; Fischer, W. (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Syst. Appl. Microbiol. 6: 183–195.

Schoen, C.; Stritzker, J.; Goebel, W.; Pilgrim S. (2004) Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. Int J Med Microbiol. 294: 319-335.

Schroeter, J. and Klaenhammer, T. (2009) Genomics of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Lett 292,1–6.

Silva, C.L. (1999) The Potencial use of Heat-Shock Proteins to Vaccinate Against Mycobacterial Infections. Microbes and Infection. 1:429-435

Silva, C.L.; Bonato, V.L.D.; Lima, K.M.; Coelho-Castelo, A.A.M.; Faccioli, L.H.; Sartori, A.; De Souza, A.O.; Leão, S.C. (2001) Cytotoxic T cells and mycobacteria. FEMS Microbiology Letters; 197:11-18.

Sinha, B.; Francois, P.; Que, Y. A.; Hussain, M.; Heilmann, C.; Moreillon, P.; Lew, D.; Krause, K.H.; Peters, G.; Herrmann, M. (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. Infect Immun 68:6871-8.

Skjot, R.L., Brock, I., Arend, S.M., Munk, M.E., Theisen, M., Ottenhoff, T.H., Andersen, P. (2002) Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9, which constitute a subfamily of the esat-6 gene family. Infect. Immun. 70, 5446–5453.

Smith, PM. and Garrett, WS. (2011) The gut microbiota and mucosal T cells. Frontiers in Microbiology - Cellular and Infection Microbiology. Mini Review Article, 26 May (1-6).

Sizemore, D.R.; Branstrom, A.A.; Sadoff, J.C. (1995) Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. Science 270, 299–302.

Smith, D.; Wiegeshaus, E.; Balasubramanian, V. (2000) An Analysis Of Some Hypotheses Related To The Chingelput Bacilli Calmette Guerin Trial. Clin Infect Dis. 31:77–80.

Sorensen, A.L.; Nagai, S.; Houen, G.; Andersen, P. (1995) Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63, 1710–1717.

Stanley, S. A.; Raghavan, S.; Hwang, W. W.; Cox, J. S. (2003) Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:13001–13006.

Steidler, L.; Hans, W.; Schotte, L.; Neiryneck, S.; Obermeier, F.; Falk, W.; Fiers, W.; Remaut, E. (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289: 1352–1355.

Stenger, S., Niazi, K.R.; Modlin, R.L. (1998) Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 161, 3582–3588.

Stiles, M.E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:331–345.

Stiles, M.E. and Holzappel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 36, 1-29.

Tacket, C.O.; Roy, M.J.; Widera, G.; Swain, W.F.; Broome, S.; Edelman, R. (1999) Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine* 17, 2826–2829.

Talbot, E.A.; Perkins, M.D.; Silva, S.F.; Frothingham, R. (1997) Tuberculosis vaccines: state of the science. *Clin Infect Dis*;24:1139–46.

Tan, T.; Lee, W.L.; Alexander, D.C.; Grinstein, S.; Liu, J. (2006) The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cell Microbiol. Sep*;8(9):1417-29.

Tang, D.C.; DeVit, M.; Johnston, S.A. (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152–154.

Tattevin, P.; Casalino, E.; Fleury, L.; Egmann, G.; Ruel, M.; Bouvet, E. (1999) The validity of medical history, classic symptoms, and chest radiographs in predicting pulmonary tuberculosis: derivation of a pulmonary tuberculosis prediction model. *Chest* 115:1248–1253.

Tekaia, F.; Gordon, S.V.; Garnier, T.; Brosch, R.; Barrell, B.G.; Cole, S.T. (1999) Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. *Tuber. Lung Dis.* 79, 329–342.

Tokuoka, M.; Tanaka, M.; Ono, K.; Takagi, S.; Shintani, T.; Gomi, K. (2008) Codon optimization increases steady-state mRNA levels in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression. *Appl Environ Microbiol*; 74:6538-46.

Trunz, B.B.; Fine, P.; Dye, C. (2006) Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet.*, Apr 8;367(9517):1173-80.

Ulmer, J.B.; Donnelly, J.J.; Parker, S.E.; Rhodes, G.H.; Felgner, P.L.; Dwarki, V.J.; Gromkowski, S.H.; Deck, R.R.; DeWitt, C.M.; Friedman, A. (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* Mar 19;259(5102), 1745–1749.

Ulmer, J.B.; Wahren, B.; Liu, M.A. (2006) Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol. Med.* 12, 216–222.

Urbach, G. (1995) Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *Int Dairy J* 5:877–903.

Van Asseldonk, M.; Rutten, G.; Oteman, M.; Siezen, R.J.; De Vos, W.M.; Simons, G. (1990) Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene* 95, 155-160.

van Egmond, M., Damen, C.A.; van Spriel, A.B.; Vidarsson, G.; van Garderen, E.; van de Winkel, J.G. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol.* 22, 205–211 (2001).

van Pinxteren, L.A.; Ravn, P.; Agger, E.M.; Pollock, J.; Andersen, P. (2000) Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 155–160.

van Wijk, F., and Cheroutre, H. (2009) Intestinal T cells: facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity. *Semin. Immunol.* 21, 130–138.

Vaughan, E.E. and Dean, D.A. (2006) Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules, *Mol. Ther.* 13 422–428.

Vilasaró, M.N.; Fonta, B.; Sala, M.; Prera, M.; Malet, A.; Mariscal, D.; Segura, F. (2008) Micobacteriosis genitourinaria: estudio retrospectivo de 45 casos en un hospital general. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 26(9):540-5

Wallis, R.S. (2007). Reactivation of Latent Tuberculosis by Tnf Blockade: The Role of Interferon Gamma. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 12:16-21

Wang, B.; Ugen, K.E.; Srikantan, V.; Agadjanyan, M.G.; Dang, K.; Refaeli, Y.; Sato, A.I.; Boyer, J.; Williams, W.V.; Weiner, D.B. (1993) Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:4156-60.

Wang, Q.M.; Sun, S.H.; Hu, Z.L.; Yin, M.; Xiao, C.J.; Zhang, J.C. (2004) Improved immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine encoding ESAT6 by DNA priming and protein boosting. *Vaccine* 22, 3622–3627.

Wang, S.; Zhang, C.; Zhang, L.; Li, J.; Huang, Z.; Lu, S. (2008) The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun methods. *Vaccine* 26, 2100–2110.

Wang, Q.L.; Pan, Q.; Ma, Y.; Wang, K.; Sun, P.; Liu, S.; Zhang, X.L. (2009) An attenuated *Salmonella*-vectored vaccine elicits protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* *Vaccine* 27, 6712–6722

Wheeler, P.R. and Ratledge, C. (1994) in *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control* (ed. Bloom, B. R.) 353–385 (Am. Soc. Microbiol., Washington DC).

Wells, J.M.; Wilson, P.W.; Norton, P.M.; Le Page, R.W. (1993a) A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3954-3959.

Wells, J.M.; Wilson, P.W.; Norton, P.M.; Gasson, M.J.; Le Page, R.W. (1993b) *Lactococcus Lactis*: High-Level Expression Of Tetanus Toxin Fragment C And Protection Against Lethal Challenge. *Mol. Microbiol.* 8:1155-1162.

Wells, J.M. and Mercenier, A. (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature.* 1038:1-14.

Wells, J. (2011) Mucosal Vaccination and Therapy with Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2:423–45.

Welman, A.D. and Maddox, I.S. (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol* 21:269–274.

Williams, J.A.; Carnes, A.E.; Hodgson, C.P. (2009) Plasmid DNA Vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv.*; 27(4): 353–370. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.02.003.

Wilson, G.L.; Dean, B.S.; Wang, G.; Dean, D.A. (1999) Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA sequences, *J. Biol. Chem.* 274, 22025–22032.

Wong, F.; Bernardi, M.; Balk, R.; Christman, B.; Moreau, R.; Garcia-Tsao, G, Patch, D.; Soriano, G.; Hoefs, J.; Navasa, M. (2005) Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club. *Gut.*;54:718-25.

World Health Organization (WHO). (2001) BCG in immunization programmes. *Weekly Epidemiol Record*; 76:33-40.

World Health Organization (WHO). (2005) Global tuberculosis control. Surveillance, planning, financing. WHO, Geneva, Switzerland.

World Health Organization (WHO). (2006a) Frequently asked questions about TB and HIV. Retrieved 6 October.

World Health Organization (WHO). (2006b) Global tuberculosis control: surveillance, planning and financing. Geneva, Switzerland: Publication WHO/HTM/TB/2006.362.

Wolf, A. J.; Linas, B.; Trevejo-Nuñez, G.J.; Kincaid, E.; Tamura, T.; Takatsu, K.; Ernst, J.D. (2007) *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function *in vivo*. *J. Immunol.* 179, 2509–2519.

Wolf, A. J.; Desvignes, L.; Linas, B.; Banaiee, N.; Tamura, T.; Takatsu, K.; Ernst, J.D. (2008) Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J. Exp. Med.* 205, 105–115.

Xiang, Z.Q.; Spitalnik, S.; Tran, M.; Wunner, W.H.; Cheng, J.; Ertl, H.C. (1994) Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology*; 199:132-40.

Xu, Z. L.; Mizuguchi, H.; Ishii-Watabe, A.; Uchida, E.; Mayumi, T.; Hayakawa, T. (2001) Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene* 272, 149–156.

Xu, Z. L.; Mizuguchi, H.; Ishii-Watabe, A.; Uchida, E.; Mayumi, T.; Hayakawa, T. (2002) Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *J Control Release*; 81:155-63.

Xu, J.; Xu, W.; Chen, X.; Zhao, D.; Wang, Y. (2008) Recombinant DNA vaccine of the early secreted antigen ESAT-6 by *Mycobacterium tuberculosis* and Flt3 ligand enhanced the cell-mediated immunity in mice. *Vaccine* 26, 4519–4525

Xu, J.; Ding, Y.; Yang, Y. (2008b) Enhancement of mucosal and cellular immune response in mice by vaccination with respiratory syncytial virus DNA encapsulated with transfersome. *Viral Immunol*; 21:483-9.

Xu, Y.; Liu, W.; Shen, H.; Yan, J.; Qu, D.; Wang, H. (2009) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the chimeric protein of antigen 85B and ESAT-6 enhances the Th1 cell-mediated response. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1121-1126

Xu, Y.; Liu, W.; Shen, H.; Yan, J.; Yang, E.; Wang, H. (2010) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing chimaeric protein of Ag85B and ESAT-6 enhances immunostimulatory activity of human macrophages. *Microbes and Infection* 12, 683-689

Yang, H.; Antony, P.A.; Wildhaber, B.E.; Teitelbaum, D.H. (2004) Intestinal intraepithelial lymphocyte gamma delta-T cell-derived keratino-cyte growth factor modulates epithelial growth in the mouse. *J. Immunol.* 172, 4151–4158.

Young, D.B. and Fruth, U. (1997) in *New Generation Vaccines* (eds Levine, M., Woodrow, G., Kaper, J. & Cobon, G. S.) 631–645 (Marcel Dekker, New York).

Yoshida, T.; Sakamoto, A.; Iwamoto, Y. (2009) Vascularized iliac bone graft in cases of ankle tuberculosis. *J Reconstr Microsurg.* 25(2):125-31

Yu, F.; Wang, J.; Dou, J.; Yang, H.; He, X.; Xu, W.; Zhang, Y.; Hu, K.; Gu, N. (2012) Nanoparticle-based adjuvant for enhanced protective efficacy of DNA vaccine Ag85A-ESAT-6-IL-21 against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, article in press.

Yuan, W.; Dong, N.; Zhang, L.; Liu, J.; Lin, S.; Xiang, Z.; Qiao, H.; Tong, W.; Qin, C. (2012) Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine expressing a fusion protein of Ag85B-Esat6-HspX in mice. *Vaccine* 30, 2490–2497.

Zaharoff, D.A.; Barr, R.C.; Li, C.Y.; Yuan, F. (2002) Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther.*; 9:1286-90.

Zhang, Y. (2005). The Magic Bullets And Tuberculosis Drug Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45:529-64

Zumla, A.; Malon, P.; Henderson, J.; Grange, J.M. (2000) Impact of HIV infection on tuberculosis. *Postgrad Med J* 76: 259–268.

VIII. ANEXOS

VIII. ANEXOS

VIII.1 Anexo I: Capítulo de Livro publicado em “Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education”.

VIII.2 Anexo II: Review publicada em “World Journal of Vaccines”.

VIII.3 Anexo III: Artigo científico apresentando os resultados obtidos.

VIII.4 Anexo IV: Meios e Soluções.

VIII.1 Anexo I

Capítulo de Livro publicado em “Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education”

Use of bacteria in DNA vaccine delivery

Vanessa Bastos Pereira¹; Marcela Santiago Pacheco Azevedo¹; Tessália Diniz Luerce Saraiva¹; Bianca Mendes Souza¹; Meritxell Zurita Turk¹; Camila Prósperi De Castro¹; Pamela Mancha Agresti¹; Fernanda Alvarenga Lima¹; Vasco Azevedo¹; Daniela Santos Pontes² and Anderson Miyoshi¹

¹Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte-MG, Brazil.

²Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus V, João Pessoa-PB, Brazil.

DNA vaccines consist in the administration of vectors that contain a eukaryotic expression cassette, responsible for coding the antigen of interest in host cells. To turn possible its transcription, a number of barriers must be surpassed. Thus, the use of bacteria, like *Lactococcus lactis*, as a vehicle to the deliver vaccine plasmids by the oral route is a promising strategy. Bacteria can invade epithelial cells or be phagocytized, allowing plasmid escape from the cytoplasm to the nucleus, resulting in the expression of the ORF of interest for its subsequent presentation to the immune system. Native *L. lactis* were used for delivering DNA both *in vitro* and *in vivo*. Aiming to make the vector delivery more efficient, recombinant *L. lactis* strains expressing invasins were tested and they showed to be able to deliver a eukaryotic expression cassette more efficiently than the wild type strain *in vitro*. In this chapter, we present a general view about DNA vaccines and the use of bacteria, especially *L. lactis* to deliver them to eukaryotic cells, which may represent a new strategy for the control of many infectious diseases.

Keywords DNA vaccine; bacterial delivery; oral mucosa; *Lactococcus lactis*

1. Concepts in DNA Vaccines

Since the inception of DNA vaccines in the early 1950s [1], several years elapsed before it was demonstrated that administration of a recombinant DNA plasmid into an animal resulted in the expression of the desired protein [2-4]. Following these findings, in 1992, Tang and colleagues showed that injection of plasmids containing the genomic copy of the human growth hormone (hGH) gene under the transcriptional control of a specific promoter was capable of eliciting a specific humoral immune reaction against hGH, suggesting that DNA could be used to induce specific immune responses [5]. Soon after, in 1993, two research groups demonstrated that immunization with a DNA plasmid could protect mice against a lethal influenza challenge [6,7]. Since then, the use of DNA as a form of vaccination has progressed very rapidly. In the past decade, several DNA vaccines designed to strike against various pathogens and tumor antigens, besides therapeutic proteins, have been tested as they are a simple way to induce immune responses, affecting not only humoral but also cellular immunity [8,9].

Therefore, up to date, four DNA vaccines have been approved in the area of veterinary medicine, being two of them prophylactic vaccines against infectious diseases, one an immunotherapy for cancer and one a gene therapy [10]. In 2005, the West Nile Virus DNA vaccine to horses and the DNA vaccine against the Infectious Hematopoietic Necrosis Virus to Salmon were licensed in the United States and Canada, respectively. Then, in 2008, a therapeutic DNA vaccine capable to express the natural form of the growth hormone, which was released in pigs, was licensed in Australia. Also, in 2010, a DNA vaccine for cancer treatment was approved and licensed for dogs affected by oral melanoma in the United States.

Despite the first successes and licensing of DNA vaccines for veterinary use, most of the studies in clinical trials have demonstrated that DNA vaccines are able to generate immune responses [9]. This vaccine platform has entered into a variety of human clinical trials for prophylactic vaccines against viral, bacterial or parasitic infections and also as a potential therapy to treat infectious diseases, many types of cancers, Alzheimer disease, allergy and autoimmune disorders. It is clear that DNA vaccination technology has established itself in the field of experimental immunotherapy, and prudent design and experimentation may represent an important component of the next generation of prophylactic and therapeutic vaccines that are efficient and economically accessible to peoples worldwide.

DNA vaccination is a vaccine strategy that conceptually combines some of the most desirable attributes of standard vaccine approaches. This vaccination strategy offers an alternative for presentation of antigenic/therapeutic molecules to the immune system in order to trigger long lasting humoral and cellular responses [11]. These vaccines are based on constructed bacterial-derived plasmid that contains a eukaryotic gene expression cassette, responsible for coding the immunogenic or immunomodulatory molecule of interest in mammalian cells, thus, allowing their *in vivo* generation. DNA vaccine plasmids can be divided into two main structures: (i) the plasmid backbone for prokaryotic propagation, which contains a bacterial origin of replication that allows for maintenance and propagation of the plasmid in host cells; and a bacterial selectable marker like an antibiotic resistance gene that ensures stable plasmid inheritance during bacterial growth. The second structure is (ii) a transcriptional unit for eukaryotic expression, which includes the promoter, used to drive optimal and high expression of the ORF (open reading frame) of interest in mammalian cells; and the polyadenylation sequence (poly A), necessary for correct transcription termination of the ORF and export of the

stable mRNA from the nucleus to the cytoplasm. Besides this, the insertion in the ORF of interest of a specific consensus sequence present in the eukaryotic mRNA, signaling the *start* codon, called Kozak sequence (ACCATGG), is necessary to initiate protein synthesis in eukaryotic cells; and to ensure correct translation termination and prevent read through, it is also important to add soluble stop-codons (Figure 1).

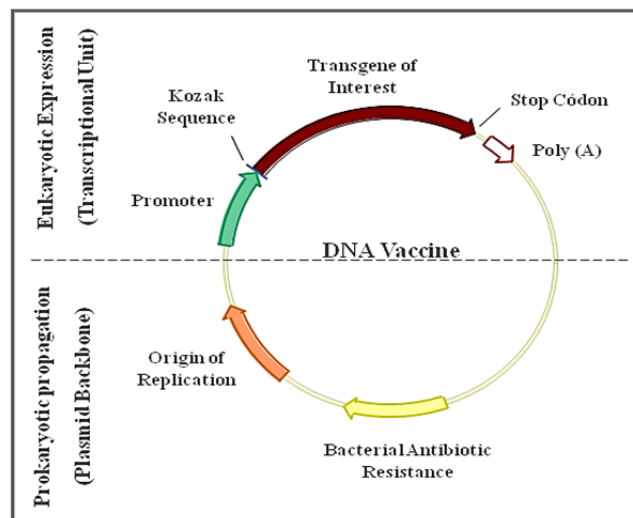


Fig. 1 Structure of DNA vaccine plasmids. The top of the figure shows the transcriptional unit (eukaryotic expression region), responsible for high-level expression of the antigen of interest in eukaryotic cells, containing the promoter, the transgene of interest with Kozak sequence, stop codon and the polyadenylation sequence (poly A). The lower part of the figure (prokaryotic region) is responsible for propagation and vaccine plasmid maintenance in bacterial cells, containing a prokaryotic replication origin and a selectable marker.

Various strategies have been developed to enhance the potential of DNA vaccines, such as i) codon usage adaptation, to maximize the expression of the ORF of interest based on generally available transfer RNA (tRNA) levels in host cells; ii) use of immunostimulatory sequences, namely unmethylated phosphodiester linked cytosine and guanine (CpG) motifs, that act through the Toll-like receptor 9 (TLR-9) to induce a series of immune stimulatory cytokines, enhancing both non-specific and antigen-specific responses; iii) use of leader sequences - enhancer elements and trans-activators of transcription can increase the activity of the promoter since they are responsible for regulation of genetic expression; iv) co-injection of immunomodulatory plasmids, like plasmids that code for cytokines - such as interleukines, interferons, stimulatory colony factors and tumoral necrosis factors, chemokines and costimulatory molecules - with the objective of increasing the quantity and potential of antigen presenting cells (APCs); and v) DNA nuclear targeting sequences (DTS), that consist on recognition sequences for endogenous DNA-binding proteins for the transport into the nucleus, which, in turn, may lead to an increase on the expression of the sequence of interest, optimizing the DNA vaccine [12-15].

DNA vaccines have a wide range of attributes that confer them many advantages over other vaccine technologies in terms of safety, ease of fabrication, stability and mobility (Table 1). Due to their highly flexible genetic design and simple structure, DNA plasmids are easily manipulated and modified in a short period of time, a critical attribute for production of vaccines against emerging pandemic threats. Furthermore, there is the possibility of encoding multiple proteins in a single construct and of adding an adjuvant to enhance their potency. Cheap and large-scale production of DNA vaccines within a short frame of time is possible too, since these are easily replicated and amplified in bacteria, besides being highly stable and easily stored. Beyond that, this vaccine platform technology represents an attractive tool due to its ability to induce all three arms of adaptive immunity: antibodies, helper T cells (T_H) and cytotoxic T-lymphocytes (CTLs), as well as innate immune responses [16].

Table 1 Advantages and Characteristics of DNA vaccines

Advantages	Characteristics
Immunogenicity	- Induction of T and B cell-specific antigen as well as live vaccines
Safety	- Inability to revert to virulent forms as live vaccines - Unlike some inactivated vaccines, the efficacy does not depend of toxic treatments - No significant adverse effects in clinical trials so far
Construction	- Modifications in transgene construct and vaccine can be made in short time - Optimization of plasmids and transcript possible
Stability	- Increased thermal stability compared to other vaccines - Longer life time
Mobility	- Easy storage and transport compared to other vaccines - There is no need for constant refrigeration
Time manufacturing	- Rapid production and formulation - Reproducible in large-scale production

Concerns exist relating to the possibility of their integration into the host's genome, development of auto-immunity, as well as resistance to the antibiotic used for selection of plasmids in bacterial cells. However, currently tested DNA vaccines have not presented relevant integration into the genome of host cells and no convincing evidence for auto-immunity development in response to a DNA vaccine exists in pre-clinical and clinical studies. Moreover, DNA vaccines show little risk of either reversion to a disease-causing form or secondary infection, as these are i) non-live, ii) non-replicating, iii) non-spreading, and iv) show fewer incidences of systemic adverse effects [17].

1.1. Routes of administration

Initially, genetic immunization consisted in the direct administration of a DNA plasmid (so-called "*naked DNA*") into tissues capable to internalize and express an immunogenic antigen, for the development of DNA vaccines, or a gene to treat or prevent a disease, for gene therapy proposals [9]. Moreover, to achieve significant levels of immunity in humans and large animals, DNA delivery methods often require very high doses of plasmids and multiple boosts [18-20]. One reason for low effectiveness of DNA vaccines in humans could be insufficient membrane permeability and cellular uptake of plasmid DNA (pDNA), resulting in poor gene expression. Therefore, more potent transfection methods for DNA vaccines and/or more effective means of delivery and potent adjuvants must be developed for the technology to realize its potential [21].

The most widely employed method to administer DNA vaccines was the intramuscular injection. Currently, many works has been published using this route of immunization with success, whether for prophylaxis or immunotherapy. As an example, a DNA vaccine for human papillomavirus type 16 (HPV-16), able to induce antigen-specific CD8(+) T-cell responses, and to confer preventive resistance to transplantable murine tumor cells and therapeutic anticancer effects in mice previously challenged with transplantable murine tumor cells [22,23]. Moreover, in another work, in human HIV vaccine trial, HIV-1 gag gene DNA was administered intramuscular route either alone or in combination with IL-12 or IL-15 plasmid cytokine adjuvants, but there were minimal responses to HIV gag DNA alone, and no apparent augmentation with either IL-12 or IL-15 plasmid cytokine adjuvants [24]. So, newer formulations or methods of delivery are being required to increase their immunogenicity.

The intramuscular route does not appear to be particularly efficient at inducing immune responses in humans, as plasmid DNA administered by this route is poorly distributed, inefficiently expressed and rapidly degraded [25]. Several studies have demonstrated the importance of direct transfection of antigen-presenting cells (APCs) to a high immune response [26,27]; however, following intramuscular immunizations, the pre-dominant cell type transfected with the DNA vaccines are myocytes [28].

Intradermal, subcutaneous, intraperitoneal, sublingual, intrarectal, ocular, intravenous and intranodal injections or application to mucosal surfaces (vaginal, nasal and oral) are other possible routes of administration, however used less frequently at the beginning of DNA vaccine research [29,30]. Even though intradermal application has been the most extensively used method to deliver DNA vaccines, a study conducted by Lechardeur and colleagues (1999) demonstrated that 90 minutes after plasmid injection only 0.1% of the injected material is able to reach the cell nucleus. Endonucleases have been implicated in degrading injected plasmids favoring this rapid elimination [31].

Thereby, to achieve significant levels of immunity, naked DNA delivery often requires very high doses of plasmids and multiple boosts [20]. Actually, DNA degradation represents a fundamental problem for genetic immunization, as destruction of incoming genes translates into loss of gene expression [32]. Therefore, several strategies have been designed to avoid DNA clearance, which would lead to a higher number of antigen-expressing cells, for instance DCs and epidermal cells, thus increasing specific T and B cell responses against the antigen.

1.2. Different cellular transfection methods

The low immunogenicity of early DNA vaccines is hypothesized to stem, in part, from inefficient uptake of the plasmids by cells due to inefficient delivery [33]. Nonetheless, the reasons for the failure of DNA vaccines to induce potent immune responses in humans have not been completely elucidated [34]. Therefore, research has focused on developing novel strategies to enhance transfection efficiency and improve other facets of the DNA vaccination platform using several strategies [10,33]. It has been shown that plasmid modifications (i.e. altered transcriptional elements, gene of interest codon optimized or use of a dual stop codon) can significantly improve either antigen transcription or translation by the host cell [10,35]. Another important effort to improve gene expression includes the delivery method employed to introduce the DNA vaccine in the organism, which have been shown to protect the DNA against degradation, facilitating its uptake by mammalian cells [34].

Several different methods for gene delivery have been proposed. They are classified in two main categories: no biological and biological methods. The first one includes physical methods, such as gene gun and electroporation [36,37] and chemical approaches, comprising the use of cationic polymers or cationic lipids (liposomes) [38].

Gene gun is a ballistic needlefree injection device that promotes cellular and humoral immunity to the antigens encoded by the DNA delivered in murine and human hosts [39-42]. This method is ideal for gene transfer directly into intracellular spaces of targeted tissues, and has several advantages, as the requirement of small amounts of DNA, the DNA is bombarded directly into cells, high transfection efficiency, high immunogenicity, and high antibody production. The disadvantage of this delivery method is the need of special device and formulation, the Th2 response may not be the response required, and it requires inert particles as carrier [43,44].

Electroporation is an electrically mediated injection technique, which induces the permeabilization of the plasma membrane creating pores and, allowing the introduction of plasmids containing foreign genes into the cells, which will subsequently express the desired genes. The reclosing of the cell membrane occurs naturally; however, the cell membrane can irreparably damaged if high voltages are applied [45,46]. This technique is rapid, simple and an efficient method, widely used for DNA delivery, membrane protein insertion and other macromolecules delivery into various types of cells, with numerous applications in the medical field and conventional biological laboratories [46].

For chemical approaches, the most studied strategy is the use of cationic polymers and cationic lipids. In these methods, the DNA is transferred to the cells through intracellular vesicles, from which a small fraction of the DNA is released into the cytoplasm and migrates into the nucleus, where transgene expression takes place. In a comparative work, animals immunized intranasally with the combination of DNA plasmids of a multiclade/multigene HIV-1 formulated with a cationic lipid adjuvant showed significantly higher IgA levels in fecal pellets, and an enhanced IgG systemic responses occurred both when the DNA was delivered mucosally and into the muscle. Animals immunized with plasmid DNA alone (naked) did not develop measurable vaccine specific systemic IgG responses and very low or no mucosal humoral responses [47]. Thus, it can be noted a need for methods that increase the levels of cell transfection, which consequently increases the level of the immune response generated by this vaccines.

Biological methods include viral and bacterial DNA delivery. Attenuated or non-pathogenic viruses have demonstrated the feasibility of gene therapy/antigen delivery. The classes most widely used for gene therapy applications are Oncoretrovirus and Lentivirus as their genome integrates into the host cellular chromatin. On the other hand, viruses like adenoviruses and herpes viruses, able to persist in the cell nucleus predominantly as extrachromosomal DNA molecules, are more preferably used for DNA vaccination. Although viral vectors have been widely used in clinical trials, their inconvenience is that they may cause genetic diseases or favor the development of cancerous cells. Actually, severe adverse effects have occurred during two independent gene therapy trials raising serious safety concerns about the use of viral vectors [48].

2. Use of bacteria as a vehicle to mucosal delivery of DNA vaccines

The use of bacterial system for DNA delivery has been extensively explored [49]. Several different bacteria can transfer vaccine plasmids to mammalian host cells becoming an active plasmid manufactures. In 1980, Schaffner observed for the first time a gene transfer from bacteria to mammalian cells when tandem copies of SV40 virus genome, carried by *E. coli* laboratory strains, were transferred into co-cultured mammalian cells [50]. Since then, many bacterial transfer systems have been developed and improved to transfer plasmid DNA into eukaryotic host cells.

The use of bacteria as vehicles for the delivery of DNA vaccines has several advantages when compared to other types of vaccinates such as naked DNA vaccination, vaccination with viral carriers or vaccination with purified or carrier-based protein antigens. Live recombinant bacteria or attenuated bacterial pathogens attend some necessary

characteristics proposed in an ideal system such as i) capacity to protect the DNA vaccine from physical elimination and enzymatic digestion, ii) ability to target inductive sites of the body allowing stimulation of the immune system and iii), capacity to appropriately stimulate innate immune system to generate effective adaptive immunity [51].

Bacterial carrier strains are easy to manufacture and allow for the maintenance of plasmids with a high cloning capacity. Stable replication of vaccine plasmids by different bacterial carrier species can be further ensured by introducing bacterial genes essential for survival or virulence within the host into the vaccine plasmids and thereby circumventing the need to co-administrate plasmid selection markers [49]. Furthermore, in contrast to immunization with naked plasmid DNA, no further plasmid amplification and purification steps are needed, thereby reducing cost and labor extensively [52,53].

Another attractive feature is their potential for oral administration, which may stimulate both mucosal and systemic immune responses [54]. Considering that oral and nasal mucosa represent the first line of defense against many pathogenic microorganisms, mucosal immunization may play a critical role in host defense against pathogens that are in direct contact with mucosal surfaces [55], which are protected by a large and highly specialized innate and adaptive immune system. Furthermore, the World Health Organization, (WHO) recommends the use of mucosal vaccines because of economic, logistic and security reasons [51,56,57]. Therefore, the development of effective strategies for the delivery of DNA vaccines to the mucosal tissues has received considerable attention over the past decade as well as the use of recombinant bacteria as carrier systems.

2.1. Immunological aspects of bacterial DNA delivery to the mucosa

After oral inoculation, bacteria carrying plasmids are recognized by immune cells and intestinal epithelial cells (IECs) lining mucosal surfaces. Some attenuated pathogenic vectors can invade IECs via the expression of some proteins termed invasins to deliver DNA vaccines, or they can either be sampled by intestinal lamina propria dendritic cell subsets (DCs) or by some specialized epithelial cells named Microfold cells (M cells) overlying Peyer's patches (PPs) [58]. The PP's are isolated lymphoid follicles in draining gut mesenteric lymph nodes, considered more accessible to antigens and bacteria present in the luminal compartment. The M cells, presents in the Gut-associated lymphoid tissue, take up particulate antigens and specific binding proteins by endocytosis and transport them to the underlying immune cells [57].

Behind bacterial invasion, it has been shown that innate immune receptors expressed by IECs and DCs, such as pattern recognition receptors (Toll-like and Nod-like receptors), can respond to some bacterial components known as microbe-associated molecular patterns (MAMPs) which serve as natural antigens after host cell invasion [59]. The bacterial recognition by the immune system modulates innate immune response, therefore, promoting a robust and lasting adaptive response [60]. After invading mammalian cells, the bacterium is usually involved by a primary vesicle, named phagosome. This vesicle then fuses to a lysosomal compartment where bacterial lysis occurs, allowing, then, the release of the plasmid DNA, which may reach the host cytosol. Therefore, the eukaryotic vector can be capable to migrate to the nucleus of the cell, where the ORF of interest is transcribed for subsequent protein synthesis by the host cellular machinery [52,61]. Exogenous antigens, presented on the surface of epithelial cells or secreted to the extracellular medium can be phagocytized by antigen presenting cells (APCs), particularly DCs residing in the subepithelial dome region of the lymphoid follicles, migrating to the nearest mesenteric lymph nodes where the antigen is presented to naïve T cells, inducing cellular and humoral immune responses specific against the encoded antigen (Figure 2).

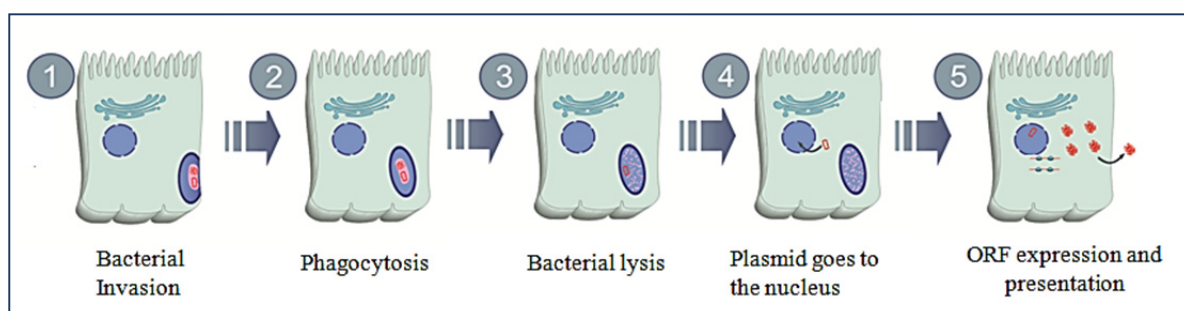


Fig. 2 Schematic representation of bacteria-mediated transfer of plasmid DNA into intestinal cells. The bacteria harboring a plasmid containing an eukaryotic expression cassette designed to express the ORF of interest entry the target cells and in the phagolysosome occurs bacterial lysis. Thus, the plasmids are released in the cytoplasm and then can be transferred into the nucleus of the host cell, occurring the expression of the ORF of interest and protein synthesis by host cells machinery (Adapted from [5]).

Overall, PP's facilitate induction of mucosal immunity, with antigen stimulated B- and T-cells able to migrate to the systemic blood supply via the lymph to be seeded back to mucosal sites around the body [62]. This enables communication from one mucosal surface to the other mucosal surfaces of the body [63]. Besides this, another

advantage of using bacteria as mucosal delivery vehicles for DNA vaccines is their potential to elicit antigen-specific secretory immunoglobulin (Ig) A responses. It is generally accepted that mucosal vaccines that elicit both secretory IgA and effective systemic immune responses could have advantages over many existing vaccines [59].

2.2. Bacteria as delivery vehicles of DNA vaccines

Currently, attenuated enteropathogenic species, such as *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli*, are the most widely used bacterial delivery systems of eukaryotic expression vectors into mammalian cells [52]. Many works has demonstrated its ability to deliver vaccine vectors to host cells and generate a significant immune response [64-68].

One great example of extracellular pathogenic bacteria that was used as a DNA vaccine vector is *Yersinia enterocolitica*. The use of this bacterium as a vector to deliver DNA was reported by Al-Mariri and co-workers. Following two intragastric immunizations in BALB/c mice, the attenuated *Yersinia* vectors harboring a DNA vaccine encoding *Brucella abortus* antigens elicited antigen-specific serum immunoglobulin and Th1-type responses among splenocytes [69]. *Listeria monocytogenes* represents another important example of a bacterial vector vastly used for DNA delivery. Several preclinical studies have demonstrated the ability of this bacterium for intracellular gene or protein delivery both *in vitro* and *in vivo* [70].

However, even though interesting, their use is limited as they present a potential risk of reversion to their wild-type (virulent) phenotype, associated risk of infection and sensitive public opinion about its use, not being completely safe for use in humans, especially in children and immunocompromised patients. Moreover, variation in the immunogenicity among the strains used has constituted a major problem as it has been difficult to reach the right balance between the level of attenuation (i.e., lack of disease symptoms) and immunogenicity (i.e., efficacy) [71].

In this regard, the use of non-pathogenic and food-grade bacteria, such as lactic acid bacteria (LAB), represent a more attractive alternative to the use of attenuated pathogenic bacteria as vehicles for mucosal delivery of DNA vaccine antigens and other therapeutic molecules because (i) they can be delivered safely at high doses and generate mucosal and systemic immune responses; (ii) some species are not immunogenic and therefore can be continuously used in immunization programs; (iii) they do not contain endotoxins such as lipopolysaccharides (LPS) on their cell wall, eliminating the risk of anaphylaxis to LPS; and (iv) they can be easily engineered to express multiple proteins and other molecules [72,73]. LAB includes mainly species of *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* and *Streptococcus*. *Lactococcus lactis* is probably the most economically important LAB species standing as a model microorganism, is very easy to manipulate and was the first one to have its genome sequenced [74,75]. Moreover, traditional fermentation performed by *L. lactis* is being used from ancient times which turned this bacterium part of the cultural and traditional custom among the indigenous communities in most developing or developed countries [76]. Therefore, as they are used for centuries in food fermentation and preservation, the FDA has granted *L. lactis* as generally regarded as safe (GRAS) microorganism for human consumption [77].

2.3. Use of wild type *Lactococcus lactis* as a vehicle for DNA delivery

After the pioneering work of Wells and colleagues, increasing attention has been given to *L. lactis* as a vehicle for the presentation of exogenous antigens at mucosal surfaces [73,78-80]. Besides being considered safe, *L. lactis* has several characteristics that make them an ideal vector for immunization [81,82]. First, it can resist the acid environment of the stomach being able to survive into the gastrointestinal tract. Another attractive property of this bacterium is that their administration is capable of inducing high production of antigen-specific IgA. As *L. lactis* is not very immunogenic, unlike pathogenic microorganisms, they can be continuously used in immunization programs [83,84]. Finally, they are capable of expressing multiple proteins and therapeutic molecules at different cell compartments as they present several expression systems [85]. *L. lactis* has been therefore widely used as vehicles for the delivery of exogenous antigens at mucosal surfaces. This bacterium is one of the most advanced prototypes of non-invasive, non-colonizing bacterial vaccine vectors. *L. lactis* can be orally administrated [86] and has been shown to stimulate the phagocytic system of the host [84].

Recently, the use of LAB as DNA vaccine delivery vehicles has been evaluated as an alternative strategy for vaccination [80,87]. Delivery of DNA into mammalian cells was demonstrated, by Guimarães and colleagues in 2006, using a wild type (wt) *L. lactis* strain harboring a DNA plasmid coding for bovine β -lactoglobulin (BLG), a major cow's milk allergen, under the transcriptional control of the viral promoter CMV (cytomegalovirus). Production and secretion of BLG was observed in the intestinal epithelial cell line Caco-2 after incubation with the recombinant *L. lactis*, demonstrating that this bacterium could efficiently deliver a fully functional plasmid into epithelial cells [86]. In order to evaluate the capacity of this bacterium to transfer DNA *in vivo* to mice IECs, Chatel and co-workers orally immunized mice with *L. lactis* carrying the same eukaryotic expression plasmid and the strain seemed to be able to translocate the intestinal membrane as BLG cDNA was detected in the epithelial cells of the immunized mice [87]. Even though these studies successfully demonstrated that *L. lactis* can be used as vector for genetic immunization, the ratio of gene transfer observed was low. Several strategies that have been shown to increase DNA delivery *in vitro* are currently being used, such as chemical treatments to weaken bacterial cell wall. *L. lactis* NZ3900 when treated with

glycine showed a higher frequency of eukaryotic expression encoding red fluorescent protein (RFP) transfer to Caco-2 cells. Treatment with penicillin and lysozyme was showed to be more effective in *S. gordonii* [88]. Recently, another very interesting approach based on the use of recombinant invasive *L. lactis* strains was developed and it has been currently being tested either *in vitro* or *in vivo*.

2.3.1. Recombinant invasive *Lactococcus lactis* as plasmid DNA delivery vehicles

Pathogenic bacteria have evolved sophisticated strategies to overcome host defenses, to interact with the immune system and to interfere with essential host systems. In order to explore the concept 'patho-biotechnology' and to increase the capacity of lactococci to persist in the gastrointestinal tract to deliver DNA vaccines, some strains of *L. lactis* expressing invasins have been reported and are thought to contain improved biotechnological and clinical applications [89,90]. One very interesting strategy performed by Guimarães and collaborators was to engineer *L. lactis* to express InlA (LL-InlA+) from *Listeria monocytogenes*. LL InlA+ is a cell wall-anchored protein and major invasin of *L. monocytogenes*, which binds to an extracellular domain of E-cadherin, its receptor [91,92]. InlA gene was cloned and expressed under transcriptional control of the native promoter. Western blot and immunofluorescence assays revealed that recombinant lactococci efficiently displayed the cell wall anchored form of InlA. Moreover, invasion rates of LL-InlA+ strain in Caco-2 cells was approximately 100-fold higher than the wild type (wt) lactococci. The recombinant strain also proved to be able to enter intestinal cells *in vivo*, after oral inoculation of guinea pigs. After internalization, LL-InlA+ was able to deliver a functional eukaryotic *gfp* gene (green fluorescent protein) into epithelial Caco-2 cells [89].

The results mentioned above were obtained through the use of a large plasmid called PLIG (10 kb), resulted from the co-integration of two replicons: one from *E. coli* and the other from *L. lactis*. After several attempts to insert antigens into this plasmid, it was concluded that its structure and size was hindering cloning procedures. Therefore, in order to circumvent this difficulty, a new plasmid termed pValac (Vaccination using Lactic acid bacteria), containing a smaller size (3742 bp), was constructed. The pValac is formed by fusion of (i) cytomegalovirus promoter (CMV), that allows the expression of the antigen of interest in eukaryotic cells, (ii) polyadenylation sequences from the bovine Growth Hormone (BGH), essential to stabilize the RNA messenger transcript, (iii) origins of replication that allow its propagation in both *E. coli* and *L. lactis* hosts, and (iv) a chloramphenicol resistance gene for selection of strains harboring the plasmid. In order to evaluate pValac functionality, the *gfp* ORF was cloned into pValac (pValac:*gfp*) and fluorescence was analyzed by transfection in PK15 cells. The applicability of pValac was demonstrated by invasiveness assays of *L. lactis* inlA+ strain harbouring pValac:*gfp* into Caco-2 cells. After transfection assays with pValac:*gfp*, it was observed that PK15 cells were able to express GFP. Moreover, *L. lactis* inlA+ strain were able to invade Caco-2 cells and deliver pValac:*gfp* into epithelial cells [93]. Due to its small size, pValac permit the cloning of large gene fragments representing, thus, a promising tool for genetic immunization.

Nevertheless, even though interesting, the use of LL-InlA+ strain presented some bottlenecks: InlA cannot bind to its receptor in mice, murine E-cadherin, thus impeding *in vivo* experiments in these animals. Therefore, it is only possible to study the effect of LL-InlA+ strain in guinea pigs or transgenic mice, which may be laborious and/or expensive [94]. For this reason, a new recombinant *L. lactis* strain expressing Fibronectin Biding Protein A (FnBPA) (LL-FnBPA+) of *Staphylococcus aureus* [95], was constructed and therefore evaluated with the goal of improving the delivery of DNA to mammalian cells [96]. FnBPA naturally mediates adhesion of *S. aureus* to the host tissue and its entry into non-phagocytic cells [97]. Thus, FnBPA utilization could facilitate the interaction of *L. lactis* with IECs leading to a more efficient delivery of DNA vaccines. *L. lactis* FnBPA+, and *L. lactis* InlA+ showed comparable internalization rates in Caco-2 cells and conventional or confocal fluorescence microscopy demonstrated big clusters of *L. lactis* FnBPA+ and *L. lactis* InlA+ which were uptaken by Caco-2 cells. Invasive lactococci were then used to deliver a eukaryotic GFP expression plasmid (pValac:*gfp*) in Caco-2. After 3 hours co-incubation, invasive *L. lactis* were capable of transferring *gfp* to Caco-2 cells more efficiently than the non-invasive strains [96]. Recently, another work was performed with LL-FnBPA+ strain in which they used the BLG allergen and GFP to characterize the potential of this strain as an *in vivo* DNA vaccine delivery vehicle. LL-FnBPA+ carrying the plasmid pValac:BLG (LL-FnBPA+ BLG) showed to be more invasive than LL-BLG noninvasive strain, after co-incubation with Caco-2 cells. Moreover strain LL-FnBPA+ BLG presented to be as invasive as LL-FnBPA+ strain. Then *in vitro* experiments demonstrated that Caco-2 cells co-incubated with LL-FnBPA+ BLG could produce up to 30 times more BLG than cells co-incubated with the noninvasive LL-BLG. Furthermore, *in vivo* it was demonstrated that, in order to effectively deliver DNA, LL-FnBPA+ requires a pre-coating with Fetal Calf Serum before oral administration. A second interesting observation concerns the fact that enterocytes were able to express cDNA of GFP or BLG without regard to the strains used (invasive or not). Finally, the use of LL-FnBPA+ could increase the number of mice producing BLG, but not the level of BLG produced. Nevertheless, the observed increase was not statically significant [98]. Since FnBPA requires an adequate local concentration of fibronectin to bind to integrins [99,100], the interaction between FnBPA and epithelial cells may be a complex process *in vivo*, being this fact one of the inconvenient of this approach. Another very interesting work was performed by De Azevedo and collaborators in 2012, when a mutated form of Internalin A (mInlA), which can bind to murine E-cadherin thus allowing *in vivo* studies in conventional mice, was expressed successfully at *L. lactis* surface (LL mInlA+). It have been shown that this novel invasive strain was capable to invade Caco-2 cells more efficiently

than the wt strain and consequently deliver more plasmid coding for cBLG. Furthermore, *in vivo* studies demonstrated that LL mInlA+ tended to increase the number of mice producing BLG [101].

All strains that have been developed to be used as vaccine DNA delivery vectors are promising for mucosal immunization and the strategy to use *L. lactis* as a tool to deliver therapeutic plasmids proved to be valuable. Therefore, in order to improve this DNA delivery, our research group are currently seeking for other invasin gene that can easily bind to murine epithelial cells from conventional mice as well as testing other LAB specie that can stay longer than *L. lactis* in the gastrointestinal tract. Both strategies are being considered feasible as it could allow the use of LAB as efficient DNA-vaccine delivery vehicles in near future [80,102].

References

- [1] Stasney J, Cantarow A, Paschkis KE. Production of neoplasms by injection of fractions of mammalian neoplasms. *Cancer Res.* 1950;10(12):775-82.
- [2] Will H, Cattaneo R, Koch HG, Darai G, Schaller H, Schellekens H, van Eerd P.M, Deinhardt F. Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature.* 1982;21;299(5885):740-2.
- [3] Dubensky TW Campbell BA, Villarreal LP. Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81(23):7529-33.
- [4] Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL: Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science.* 1990;247:1465-1468.
- [5] Tang DC, DeVit M, Johnston, SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 1992;356:152-154.
- [6] Fynan EF, Webster RG, Fuller DH; Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993;90: 11478-11482.
- [7] Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.* 1993;19;259(5102), 1745-1749.
- [8] Ingolotti M, Kawalekar O, Shedlock DJ, Muthumani K, Weiner DB. DNA vaccines for targeting bacterial infections. *Expert Rev Vaccines.* 2010; 9(7):747-63.
- [9] Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunological Reviews.* 2011;239:62-84.
- [10] Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics.* 2008;9:776-88.
- [11] Guranathan S, Wu CY, Freidag BL, Seder RA. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(4):442-7
- [12] Dean DA, Dean BS, Muller S, Smith LC. Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp. Cell Res.* 1999;253: 713-722.
- [13] Wang S, Farfan-Arribas DJ, Shen S, Chou TH, Hirsch A, He F, Lu S. Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine.* 2006;24, 4531-4540.
- [14] Chong SY, Egan MA, Kutzler MA, Megati S, Masood A, Roopchand V, Garcia-Hand D, Montefiori DC, Quiroz J, Rosati M, Schadeck EB, Boyer JD, Pavlakis GN, Weiner DB, Sidhu M, Eldridge JH, Israel ZR. Comparative ability of plasmid IL-12 and IL-15 to enhance cellular and humoral immune responses elicited by a SIVgag plasmid DNA vaccine and alter disease progression following SHIV(89.6P) challenge in rhesus macaques. *Vaccine.* 2007;25:4967-82.
- [15] Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:795-804.
- [16] Li L, Saade F, Petrovsky N. The future of human DNA vaccines. *J Biotechnol.* 2012;S0168-1656(12)00614-1.
- [17] Cattamanchi A, Posavad CM, Wald A, Baine Y, Moses J, Higgins TJ, Ginsberg R, Ciccarelli R, Corey L, Koelle DM. Phase I study of a herpes simplex virus type 2 (HSV-2) DNA vaccine administered to healthy, HSV-2-seronegative adults by a needle-free injection system. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15:1638-43.
- [18] Van Drunen Littel-van den Hurk S, Gerdts V, Loehr BI, Pontarollo R, Rankin R, Uwiera R, Babiuk LA. Recent advances in the use of DNA vaccines for the treatment of diseases of farmed animals. *Adv. Drug Del. Rev.* 2000;43, 13-28.
- [19] Le TP, Coonan KM, Hedstrom RC, Charoenvit Y, Sedegah M, Epstein JE, Kumar S, Wang R, Doolan DL, Maguire JD, Parker SE, Hobart P, Norman J, Hoffman SL. Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine.* 2000;18, 1893-1901
- [20] Babiuk LA, Pontarollo R, Babiuk S, Loehr B, Little VD, Den Hurk VS. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. 2003; *Vaccine* 21:649-658.
- [21] Kanazawa T, Takashima Y, Hirayama S, Okada H. Effects of menstrual cycle on gene transfection through mouse vagina for DNA vaccine *International Journal of Pharmaceutics.* 2008;360, 164-170
- [22] Lasaro MO, Tatsis N, Hensley SE, Whitbeck JC, Lin SW, Rux JJ, Wherry EJ, Cohen GH, Eisenberg RJ, Ertl HC. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. *Nat. Med.* 2008;14:205-212.
- [23] Diniz MO, Lasaro MO, Ertl HC, Ferreira LC. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17(10):1576-83. Epub 2010 Aug 25.
- [24] Kalams SA, Parker S, Jin X, Elizaga M, Metch B, Wang M, Hural J, Lubeck M, Eldridge J, Cardinali M, Blattner WA, Sobieszczyk M, Suriyanon V, Kalichman A, Weiner DB, Baden LR; Safety and immunogenicity of an HIV-1 gag DNA vaccine with or without IL-12 and/or IL-15 plasmid cytokine adjuvant in healthy, HIV-1 uninfected adults. NIAID HIV Vaccine Trials Network. *PLoS One.* 2012;7(1):e29231.

- [25] Wang S, Zhang C, Zhang L, Li J, Huang Z, Lu S. The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun methods. *Vaccine*. 2008;26, 2100–2110.
- [26] Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD Jr. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nature Med*. 1996;2, 1122–1128.
- [27] Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8⁺ T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med*. 1998;188, 1075–1082.
- [28] Danko I, Williams P, Herweijer H, Zhang G, Latendresse JS, Bock I, Wolff JA. High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents. *Hum. Mol. Genet*. 1997;6, 1435–1443.
- [29] McCluskie MJ, Brazolot Millan CL, Gramzinski RA, Robinson HL, Santoro JC, Fuller JT, Widera G, Haynes JR, Purcell RH, Davis HL. Route and method of delivery of DNA vaccine influence immune responses in mice and non-human primates. *Mol Med*. 1999;5(5):287-300.
- [30] Faurez F, Dory D, Le Moigne V, Gravier R, Jestin A. Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. 2010; *Vaccine*. 21;28(23):3888-95.
- [31] Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, Joshi PB, Monck M, Graham RW, Beatty B, Squire J, O'Brodovich H, Lukacs GL. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther*. 1999; 6(4):482-97.
- [32] Barry ME, Pinto-González D, Orson FM, McKenzie GJ, Petry GR, Barry MA. Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. *Hum Gene Ther*. 1999; 10;10(15):2461-80.
- [33] Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin Infect Dis*. 2011; 53(3):296-302
- [34] Bolhassani A, Safaiyan S, Rafati S. Improvement of different vaccine delivery systems for cancer therapy. *Molecular Cancer*. 2011;10:3.
- [35] Williams JA, Carnes AE, Hodgson CP. Plasmid DNA Vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv*. 2009;4:353–370.
- [36] Frelin L, Brass A, Ahlén G, Brenndörfer ED, Chen M, Sällberg M. Electroporation: a promising method for the nonviral delivery of DNA vaccines in humans? *Drug News Perspect*. 2010 Dec;23(10):647-53.
- [37] Kwak K, Jiang R, Jagu S, Wang JW, Wang C, Christensen ND, Roden RB. Multivalent human papillomavirus 11 DNA vaccination utilizing electroporation. *PLoS One*. 2013;8(3):e60507.
- [38] Sun K, Li X, Jiang J, Cheng A, Wang M, Zhu D, Jia R, Chen S, Zhou Y, Chen X, Wang X. Distribution characteristics of DNA vaccine encoded with glycoprotein C from Anatid herpesvirus 1 with chitosan and liposome as deliver carrier in ducks. *Virology*. 2013 Mar 16;10(1):89.
- [39] Lodmell DL, Ray NB, Ewalt LC. Gene gun particle mediated vaccination with plasmid DNA confers protective immunity against rabies virus infection. *Vaccine*. 1998;16:115–118.
- [40] Tacket CO, Roy MJ, Widera G, Swain WF, Broome S, Edelman R. Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine*. 1999, 17:2826–2829.
- [41] Yoshida A, Nagata T, Uchijima M, Higashi T, Koide Y. Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses. *Vaccine*. 2000;18:1725–1729.
- [42] Fuller DH, Loudon P, Schmaljohn C. Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods*. 2006; 40:86–97.
- [43] Dileo J, Miller Jr TE, Chesnoy S, Huang L. Gene transfer to subdermal tissues via a new gene gun design. *Hum Gene Ther*. 2003; 14: 79–87.
- [44] Trimble C, Lin CT, Hung CF, Pai S, Juang J, He L, Gillison M, Pardoll D, Wu L, Wu TC. Comparison of the CD8⁺ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. *Vaccine*. 2003; 21:4036–4042.
- [45] Parham J, Iannone M, Overton L, Hutchins J. Optimization of transient gene expression in mammalian cells and potential for scale-up using flow electroporation. *Cytotechnology*. 1998;28, 147–155.
- [46] Kima J, Choa K, Shin Y, Jung N, Chunga C, Changa J. A multi-channel electroporation microchip for gene transfection in mammalian cells. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;22, 3273–3277
- [47] Brave A, Hallengard D, Schroder U, Blomberg P, Wahren B, Hinkula J. Intranasal immunization of young mice with a multigene HIV-1 vaccine in combination with the N3 adjuvant induces mucosal and systemic immune responses. *Vaccine*. 2008; 26,5075–5078.
- [48] Pichon C, Billiet L, Midoux P. Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Curr Opin Biotechnol*. 2010; 21(5):640-5.
- [49] Pilgrim S, Stritzker J, Schoen C, Kolb-Mäurer A, Geginat G, Loessner MJ, Gentschev I, Goebel W. Bactofection of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: improvement and mechanism of DNA delivery. 2003; *Gene Ther*. 10(24):2036-45.
- [50] Schaffner W. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1980;77: 2163–2167.
- [51] Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*. 2005;11: S45–S53
- [52] Schoen C, Stritzker J, Goebel W, Pilgrim S. Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int J Med Microbiol*. 2004;294: 319-335.
- [53] Becker PD, Noerder M, Guzmán CA. Genetic immunization: bacteria as DNA vaccine delivery vehicles. *Hum Vaccin*. 2008;4(3):189-202.
- [54] Srivastava IK, Liu MA. Gene vaccines. *Ann Intern Med*. 2003;1;138(7):550-9.
- [55] Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, Lamarre A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect*. 2001; 3(12):1021-35.
- [56] Seow Y, Wood MJ. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Mol Ther*. 2009;17(5):767-77.

- [57] Wells J. Mucosal Vaccination and Therapy with Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2011;2:423–45.
- [58] Weiss S, Chakraborty T. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells by bacterial carriers. *Curr Opin Biotechnol.* 2001; 12(5):467-72.
- [59] Barbosa T, Rescigno M. Host-bacteria interactions in the intestine: homeostasis to chronic inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010; 2(1):80-97
- [60] Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004; 5(10):971-4
- [61] Grillot-Courvalin C, Goussard S, Courvalin P. Bacteria as gene delivery vectors for mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol.* 1999;10: 477–481.
- [62] Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. *Mucosal Immunol.* 2008;1:31–37.
- [63] Kaiserlian D, Etchart N. Entry sites for oral vaccines and drugs: A role for M cells, enterocytes and dendritic cells? *Semin. Immunol.* 1999;11 (3), 217-24.
- [64] Shata MT, Hone DM. Vaccination with a Shigella DNA vaccine vector induces antigen-specific CD8(+) T cells and antiviral protective immunity. *J. Virol.* 2001;75, 9665–9670.
- [65] Woo PC, Wong LP, Zheng BJ, Yuen KY. Unique immunogenicity of hepatitis B virus DNA vaccine presented by live-attenuated Salmonella typhimurium. *Vaccine.* 2001;19, 2945–2954.
- [66] Zheng B, Woo PC, Ng M, Tsoi H, Wong L, Yuen K.. A crucial role of macrophages in the immune responses to oral DNA vaccination against hepatitis B virus in a murine model. *Vaccine.* 2001;20, 140–147.
- [67] Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim YH, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y. Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing Listeria monocytogenes strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infection and Immunity.* 2004;72,4,2014–2021.
- [68] Wang QL, Pan Q, Ma Y, Wang K, Sun P, Liu S, Zhang XL. An attenuated Salmonella-vectored vaccine elicits protective immunity against Mycobacterium tuberculosis. *Vaccine.* 2009;27,48, 6712–6722.
- [69] Al-Mariri A, Tibor A, Lestrade P, Mertens P, De Bolle X, Letesson JJ. *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding Brucella abortus bacterioferritin or P39 antigen. *Infect Immun.* 2002; 70(4):1915-23.
- [70] Tangney M, Gahan CG. *Listeria monocytogenes* as a vector for anti-cancer therapies. *Curr Gene Ther.* 2010 Feb;10(1):46-55.
- [71] Dunham, S.P. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Res Vet Sci.* 2002;73: 9–16.
- [72] Mercenier A, Muller-Alouf H, Grangette C. Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2000;2(1): 17-25.
- [73] Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature.* 2008;1038: 1-14.
- [74] De Vos, W.M. & Simons, G.F.M. Gene cloning and expression systems in lactococci. In: M. J. Gasson and W. M. de Vos (Ed.). *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria.* Chapman & Hill, Glasgow. 1994; 52-105
- [75] Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malmme K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 2001;11:731–753.
- [76] Chelule PK, Mokoena MP, Gqaleni N. Advantages of traditional lactic acid bacteria fermentation of food in Africa. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* 2010; 1160-1167
- [77] Van de Guchte M, Ehrlich SD, Maguin E. Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J Appl Microbiol.* 2001; 91(1):147-53
- [78] Langella P, Le Loir Y. Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32(2):191-8
- [79] Nouaille S.; Ribeiro, L.A.; Miyoshi, A.; Pontes, D.; Le Loir, Y.; Oliveira, S.C.; Langella, P.; Azevedo, V. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res.* 2003; 31;2(1):102-11
- [80] Pontes DS, de Azevedo MS, Chatel JM, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A. *Lactococcus lactis* as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expr Purif.* 2011;79(2):165–75.
- [81] Miyoshi A, Jamet E, Commissaire J, Renault P, Langella P, Azevedo V. A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 239(2):205-12
- [82] Brondyk WH. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods Enzymol.* 2009; 463:131-47
- [83] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 2005; 22(4):249-70
- [84] Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6:148-58
- [85] Gilbert C, Robinson K, Le Page RW, Wells JM. Heterologous expression of an immunogenic pneumococcal type 3 capsular polysaccharide in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun.* 2000; 68(6):3251-60
- [86] Guimarães VD, Innocentini S, Lefèvre F, Azevedo V, Wal JM, Langella P, Chatel JM. Use of Native Lactococci as Vehicles for Delivery of DNA into Mammalian Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology.* 2006;7091–7097
- [87] Chatel JM, Pothelune L, Ah-Leung S, Corthier G, Wal JM, Langella P. In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Therapy.* 2008; 1–7.
- [88] Tao L, Pavlova SI, Ji X, Jin L, Spear G. A novel plasmid for delivering genes into mammalian cells with noninvasive food and commensal lactic acid bacteria. *Plasmid.* 2011; 65(1):8-14.
- [89] Guimarães VD, Gabriel JE, Lefèvre F, Cabanes D, Gruss A, Cossart P, Azevedo V, Langella P. Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes and Infection.* 2005;7:836–844.
- [90] Sleator RD, Hill C. Patho-biotechnology: using bad bugs to do good things. *Curr Opin Biotechnol.* 2006; 17(2):211-6.
- [91] Gaillard JL, Berche P, Frehel C, Gouin E, Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci, *Cell.* 1991;65 1127–1141.
- [92] Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege RM, Cossart P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell.* 1996; 22;84(6):923-32.

- [93] Guimarães V, Innocentini S, Chatel JM, Lefèvre F, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A. A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genet Vaccines Ther.* 2009; 10;7:4.
- [94] Wollert T, Pasche B, Rochon M, Deppenmeier S, van den Heuvel J, Gruber AD, Heinz DW, Lengeling A, Schubert WD. Extending the host range of *Listeria monocytogenes* by rational protein design. *Cell.* 2007; 129(5):891-902
- [95] Que YA, François P, Haefliger JA, Entenza JM, Vaudaux P, Moreillon P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun.* 2001;69: 6296-6302.
- [96] Innocentini S, Guimarães V, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Chatel JM, Lefèvre F. *Lactococcus lactis* Expressing either *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Protein A or *Listeria monocytogenes* Internalin A Can Efficiently Internalize and Deliver DNA in Human Epithelial Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75 (14): 4870-4878.
- [97] Sinha B, François PP, Nüsse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol.* 1999; 1(2):101-17
- [98] Pontes D, Innocentini S, Del Carmen S, Almeida JF, Leblanc JG, de Moreno de Leblanc A, Blugeon S, Cherbuy C, Lefèvre F, Azevedo V, Miyoshi A, Langella P, Chatel JM. Production of Fibronectin Binding Protein A at the Surface of *Lactococcus lactis* Increases Plasmid Transfer In Vitro and In Vivo. *PLoS One.* 2012; 7(9):e44892.
- [99] Ozeri V, Rosenshine I, Mosher DF, Fässler R, Hanski E. Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol Microbiol.* 1998; 30:625-637
- [100] Dziejwanowska K, Carson AR, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Bohach GA. Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect Immun.* 2000; 68(11):6321-8
- [101] De Azevedo M, Karczewski J, Lefèvre F, Azevedo V, Miyoshi A, Wells JM, Langella P, Chatel JM. In vitro and in vivo characterization of DNA delivery using recombinant *Lactococcus lactis* expressing a mutated form of *L. monocytogenes* Internalin A. *BMC Microbiol.* 2012; 12:299.
- [102] Bermúdez-Humarán LG, Kharrat P, Chatel JM, Langella P. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microb Cell Fact.* 2011; 10 (Suppl 1):1-10

VIII.2 Anexo II

Review publicada em “World Journal of Vaccines”

DNA Vaccines Approach: From Concepts to Applications

Vanessa Bastos Pereira^{1*}, Meritxell Zurita-Turk^{1*}, Tessália Diniz Luerce Saraiva¹,
Camila Prósperi De Castro¹, Bianca Mendes Souza¹, Pamela Mancha Agresti¹,
Fernanda Alvarenga Lima¹, Vanessa Nathalie Pfeiffer¹,
Marcela Santiago Pacheco Azevedo¹, Clarissa Santos Rocha¹, Daniela Santos Pontes²,
Vasco Azevedo¹, Anderson Miyoshi^{1#}

¹Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

²Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), João Pessoa, Brazil

Email: #miyoshi@icb.ufmg.br

Received 25 February 2014; revised 25 March 2014; accepted 2 April 2014

Copyright © 2014 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

DNA vaccines are the third generation vaccines based on purified plasmid preparations containing transgenes that encode antigenic/therapeutic proteins or peptides capable of triggering an immune response against a wide range of diseases. This vaccine platform presents several attributes that confer distinct advantages over other vaccine technologies in terms of safety, ease of fabrication and stability. Many aspects, such as antigen expression and especially vector design, are under study because of their great influence on immunogenicity and efficacy of DNA vaccines. In this regard, with the attempt of improving the efficiency of DNA vaccines, co-expression of stimulatory sequences and diverse vector delivery systems are being optimized. With this in mind, this review aims to giving a conceptual approach of DNA vaccines, explaining their mechanisms of action and listing the already licensed veterinary DNA vaccines presented in the market.

Keywords

DNA Vaccines, Vector Design, Delivery Systems, Approved DNA Vaccines, Bacterial Delivery

1. Introduction

According to World Health Organization (WHO) estimates, 18 million people die each year as a direct conse-

*These authors contributed equally to this work.

#Corresponding author.

quence of infection, showing that these diseases still remain a considerable burden worldwide for which no effective treatment or vaccine exists [1]. Furthermore, we can also add the problems related to inefficient drug therapies and increase microbial resistance to antimicrobials and antibiotics treatments [2] [3]. Moreover, new pathogens and “old” infectious diseases which have been thought to be extinct have emerged over the last two decades, highlighting the importance of developing new vaccines against infectious agents over the last century [4].

Vaccination represents one of the most cost-efficient tools to combat and eradicate diverse pathogenic and/or infectious agents spread around the world. Several infectious diseases, such as polio, measles, diphtheria, rubella, mumps and tetanus can be controlled and, in many cases, be eradicated with current vaccines as these have been used to mimic natural infections activating an immune response and consequently an immune protection without any potential harmful effects to patients.

There exist different types of vaccines in clinical use. Currently, all licensed vaccines are based on killed or live-attenuated microorganisms, purified products derived from microorganisms, such as inactivated toxins, purified antigens or polysaccharides conjugated to proteins which are able to efficiently induce humoral (antibody) and/or cellular immune responses essential to prevent and control diseases of global importance (Table 1). However, it is well known that some of these vaccines may cause harmful side effects or health risks in a sensitive part of the population and some can even present several disadvantages, including expensive costs, limited coverage, weak induction of cell-mediated immune responses, limited storage conditions and the inadequacy of the use of needles for some vaccine administration [5]. Moreover, vaccines for many pathogens, such as the human immunodeficiency virus and the agents of malaria and tuberculosis are until now ineffective or unavailable [6], being the lack of vaccines to prevent or treat these complex diseases one of the major public health problems in the world.

Several factors still limit the effectiveness of vaccination, which must be overcome with the advances in the biotechnology field and a deeper comprehension of the immune system. In this regard, an ideal vaccine should include the following characteristics: 1) safe profile for the entire population; 2) long-term immunity and efficacy; 3) single dose administration; 4) easy administration through mucosal routes; 5) simple manufacturing; 6) resistance to temperature changes; 7) multivalency and 8) disease control [7]. In this regard, a new generation of vaccines is being developed to overcome technological limitations and to achieve safety and desirable requirements to prevent and/or treat diseases [7].

The era of genomics, proteomics, transcriptomics and metabolomics opens a new perspective for the development of new vaccines, playing an important role in the identification of potential antigens and drug targets, and in a better understanding of pathogens and their interactions with the host immune system. Moreover, the nature and the persistence of the immune response are very important points to be analyzed in new vaccination strategies. And, recently, several approaches, such as DNA vaccines, have been developed to improve vaccine safety and efficacy using sophisticated biological technologies.

Perspectives for new and potential vaccines and therapeutic biotechnology emerged in 1950 when Stasney and colleagues showed that the features responsible for cancer malignancy were present in the chromatin of tumor cells and could be transferred to normal cells [8]. Following, several researchers demonstrated that plasmids harboring a desired gene sequence could be delivered into eukaryotic cells to target protein expression [9]-[11] and in 1992 Tang and colleagues showed that injection of plasmids containing the genomic copy of the human growth hormone (hGH) gene was capable of eliciting a specific humoral immune reaction against the hormone,

Table 1. Overview of the current vaccine platforms (Adapted from [60]).

Vaccine Types	Characteristics	Immune Aspects	Main Disadvantages
Attenuated Vaccines	Replicative live vaccine	TCD8+ cells activation	Potential reversion of pathogenicity
Inactivated Vaccines	Inactive vaccines	B cells activation	Poor induction of T-cell response
Subunit Vaccines	Antigens from pathogens	TCD8+ and B cells activation	Immunogen preparation
Toxoid	Inactivated toxin	B cells activation	Transitory effect
Vectored Vaccines	Recombinant live vaccine	TCD8+ and B cells activation	Potential of adverse effects
DNA Vaccine	Recombinant plasmid expressing antigen of interest	TCD8+ and B cells activation	Less efficient induction of antibody response

suggesting that DNA could also be used to induce specific immune responses against infectious diseases [12]. Soon after, in 1993, two different research groups demonstrated that immunization with a DNA plasmid could protect mice against a lethal influenza challenge [13] [14]. Since then, great interest in developing DNA vaccines, mainly due to their ability to elicit both humoral and cellular immune responses as well as protecting and even having therapeutic benefits in a variety of animal models for a wide range of disease targets, has emerged.

DNA vaccines are the third generation vaccines that have been developed in order to overcome undesired properties of current conventional vaccines, since they can stimulate concomitantly different types of immune responses, improve vaccine stability and facilitate large-scale manufacturing. Diverse studies have already shown the potential of these new generation vaccines in preventing various infectious diseases in preclinical animal models and, also, their applications in immunotherapy to treat different types of cancer, allergies and autoimmune diseases [15].

Great progress has been made in the field of DNA vaccination and many works have shown good results, proving that DNA vaccines are able to induce efficient immune responses in animals using genes from a variety of infectious agents, including influenza virus, hepatitis B virus, human immunodeficiency virus, human papilloma virus and *Mycobacterium tuberculosis*. However, each DNA vaccine has to be well evaluated considering its applicability, the nature of the agent being immunized against, the nature of the antigen and the type of immune response required for protection. Until now, only four DNA vaccines [16]-[20] have been licensed for veterinary use. Despite the success of these DNA vaccines and the positive results of others in clinical trials, the efficiency of DNA vaccines in primates and humans is still lower than most researchers had anticipated [21]. Nevertheless, it is generally believed that the advances in DNA vaccine technology will offer customized and tailored vaccines to any disease in the future, representing an important component of next generation of prophylactic and therapeutic vaccines, efficient and economically accessible to peoples worldwide.

2. Elements of DNA Vaccine Vector Design

Several approaches have been leading the way to develop innovative, efficient, safe and promising vaccine modalities for humans and animals in the last years. Bacterial derived plasmid vectors are used in DNA-based vaccination to express molecules of medical and veterinary interest. These plasmids must internalize eukaryotic cells and reach their nucleus, where DNA transcription and translation of the gene of interest is driven by the cells. To achieve an efficient plasmid delivery into eukaryotic cells it is important to design and engineer plasmids that allow maximum transfection efficiency and protein expression.

DNA plasmids used for vaccination are based on constructed bacterial-derived plasmids that contain a eukaryotic gene expression cassette, responsible to code the immunogenic or immunomodulatory molecule of interest in mammalian cells, and thus, allowing their *in vivo* generation. DNA vaccine plasmids can be divided into two main structures: 1) the plasmid backbone, necessary for prokaryotic propagation and which contains a bacterial origin of replication and a bacterial selectable marker like an antibiotic resistance gene, and 2) a transcriptional unit, required for eukaryotic expression, which includes the promoter, used to drive optimal and high expression of the ORF (open reading frame) of interest in mammalian cells, and the Polyadenylation (poly A) sequence. Besides these two main structures it is also necessary to insert in the ORF of interest a specific consensus sequence present in the eukaryotic mRNA, called Kozak sequence (ACCATGG), which signals the *start* codon and is necessary to initiate protein synthesis in eukaryotic cells. To ensure correct translation termination and prevent read through, it is also important to add stop-codons in the ORF (Figure 1).

The replication region of the plasmid backbone allows the maintenance and propagation of the plasmid in host cells for stable inheritance of the plasmid during bacterial growth, as well as to determine the plasmid's host-range [22]. Nowadays, most of the plasmids used for this purpose derive from the pBR322 or pUC plasmids. It is preferred to use origins of replication that provide large copy DNA plasmids in bacteria with high purification yields in a short period of time, such as the *Escherichia coli* (*E. coli*): ColEI origin of replication [23].

Selectable markers, like bacterial antibiotic resistance genes, ensure stable plasmid inheritance during bacterial growth and kanamycin is one of the most widely used today [24]. Although antibiotic resistance genes represent powerful selectors, their use is discouraged by regulatory authorities due to concerns regarding plasmid transformation, alteration of microorganisms-associated characteristics of the patients and the spread of antibiotic resistance genes throughout the host's body [22]. Although antibiotic selection systems are important and convenient for cloning steps, these are undesirable within a DNA vaccine plasmid. Considering this issue, anti-

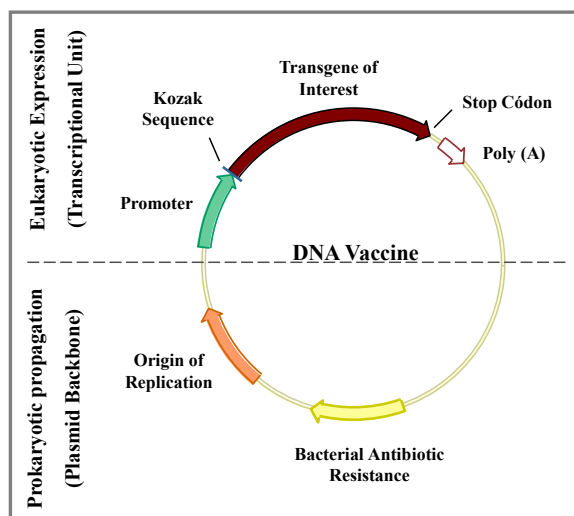


Figure 1. Structure of DNA vaccine plasmids. The top of the figure shows the transcriptional unit (eukaryotic expression region), responsible for high-level expression of the antigen of interest in eukaryotic cells, containing the promoter, the transgene of interest with the Kozak sequence, stop codon and polyadenylation sequence (poly A). The lower part of the figure (prokaryotic region) is responsible for propagation and vaccine plasmid maintenance in bacterial cells, containing a prokaryotic replication origin and a selectable marker (Adapted from [143]).

biotic free selection systems have to be developed by implementation of combined approaches [25] [26].

Promoters are required in plasmids to drive optimal and high expression of the gene of interest in mammalian cells. In general, virally-derived promoters, such as the cytomegalovirus (CMV) and the simian virus 40 (SV40) promoters are used for such purpose as these provide greater gene expression *in vivo* compared to other eukaryotic promoters [27]. Currently, the CMV promoter drives high constitutive transgene expression levels and is the strongest and most widely used promoter in traditional DNA vaccines formulations [28]. However, alternatives to viral promoters are under investigation and include non-viral promoters of which the major histocompatibility complex class II (MHC-II) promoter is the most representative [29].

The insertion of the specific consensus sequence called Kozak sequence (ACCATGG) is necessary to initiate protein synthesis in eukaryotic cells. To prevent incorrect translation in the cell and which could lead to oversized and incorrect product folding and interfere with mRNA stability, it is also important to add one or two stop-codon sequences [30].

On the other hand, poly A sequence signal (AAUAAA) inclusion next to the 3' extremity of the sequence of interest is essential for efficient transcriptional termination and exportation of the mRNA from the nucleus to the cytoplasm, playing also a very important role in mRNA stability and eukaryotic expression. The Bovine Growth Hormone (BGH) polyadenylation signal is widely and efficiently used to achieve high level of expression peptides in eukaryotic cells [31].

3. Advantages of DNA Vaccines

DNA vaccines have a wide range of attributes that confer them distinct advantages over other vaccine technologies in terms of safety, ease of fabrication, stability and immunogenicity (Table 2).

Opposite to traditional vaccines developed against pathogens, which include either killed or attenuated pathogenic agents, DNA vaccines do not involve unsafe infectious agents, present no risk of pathogenicity and can be safely administered to anyone. Furthermore, DNA vaccines can efficiently activate the three arms of adaptive immunity—antibodies, helper T cells (T_h) and cytotoxic T-lymphocytes (CTLs)—as well as innate immune responses [32].

Table 2. Advantages/Characteristics of DNA vaccines (Adapted from [144]).

Advantages	Characteristics
Immunogenicity	<ul style="list-style-type: none"> • Induction of T and B cell-specific antigen
Safety	<ul style="list-style-type: none"> • Inability to revert to virulent forms • The efficacy does not depend on toxic treatments • No observed significant adverse effects in clinical trials so far
Construction	<ul style="list-style-type: none"> • Modifications in the transgene construct and vaccine can be made in short time • Optimization of plasmids and transcript is possible
Stability	<ul style="list-style-type: none"> • Increased thermal stability—Long life time
Mobility	<ul style="list-style-type: none"> • Easy storage and transport—No need for constant refrigeration
Time manufacturing	<ul style="list-style-type: none"> • Rapid production and formulation • Reproducible in large-scale production

Due to their highly flexible genetic design and simple structure, DNA plasmids can be easily manipulated and modified in a short period of time, a critical attribute when producing vaccines against emerging pandemic threats. Cheap and large-scale production of DNA vaccines is possible since DNA plasmid vaccine vectors can be easily replicated and amplified in bacteria. Another important advantage is that DNA vaccines are highly stable at room temperature and easily stored, as they do not require special refrigeration, making them very practical for use in developing nations [33].

Moreover, DNA vaccines are highly flexible and able to code multiple proteins in a single construct, including viral or bacterial antigens and immunological and biological proteins, creating multigenes or multivalent vaccines with the possibility of adjuvant addition to enhance their potency [23] [34]. It is also worth mentioning that DNA vaccines can be used therapeutically [35], as they are unable to induce auto-immunity and have theoretically unlimited boosting potential, which could be very useful in areas of cancer vaccine development which require repetitive boosting of T cell responses to combat tumor antigens.

Despite the clear advantages DNA vaccines present, it is important to take into consideration some safety concerns associated to the possibility of DNA plasmid integration into the host's cell genome, development of auto-immunity, as well as resistance of the antibiotic gene markers that should be addressed in appropriate animal tests and human trials. However, DNA vaccines already tested did not present relevant integration into the genome of host cells [36]-[39] and no convincing evidences for the development of an auto-immune responses against DNA vaccines exist in pre-clinical studies performed in non-human primates and in humans [40]-[42].

4. Mechanism of Action and Immunology of Prophylactic DNA Vaccines

The main purpose of prophylactic vaccination is to prime both humoral and cellular immune responses against specific antigens. It appears that innate responses that augment the adaptive response may also be crucial. In this context, DNA vaccines represent a potential strategy to reach the desirable immune responses to raise immunity protection against diseases. The capacity of genetic immunization to induce immune responses was firstly documented in 1992 by Tang *et al.*, who demonstrated that mice inoculated with micro projectiles coated with plasmid DNA harboring the human growth hormone (hGH) sequence were able to produce a specific anti-hGH immune response [12]. This result opened new perspectives for the development of DNA vaccine delivery systems and several approaches have shown since then the potential and efficacy of this new technology to induce immune responses.

The general mechanism of action of DNA vaccines consists of *in vivo* DNA plasmid inoculation and expression of the gene of interest by host cells. Once the DNA plasmid is administered and internalized by the cells, the plasmid uses a net of microtubules and their associated motor proteins in the cytoplasm to reach the cellular nucleus [43]. Following, transcription and translation of the transgene occurs via the host's cellular machinery and the produced proteins are then presented to the surface of cells to become a target of the immune system. In contrast, when DNA vaccines are administered for therapeutic purposes, the produced proteins must be secreted outside the cells to stimulate the immune system and generate both humoral and cellular immune responses. Several studies have demonstrated the importance of direct transfection of antigen-presenting cells (APCs) and

their critical role in DNA vaccine immunogenicity. Dendritic cells (DCs) are probably the most important APCs associated with the capture and processing of antigens via receptor-mediated endocytosis and its presentation to MHC class I and II. CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes can be activated during the process of DNA vaccination, inducing cellular immune and specific antibodies responses [44] [45].

DNA vaccines for prophylactic or therapeutic uses can be administered via different routes: intradermal, intravenous, intraperitoneal, subcutaneous and intramuscular [46] [47]. The intramuscular route is one of the most common and successful routes of immunization used in DNA vaccine studies both for prophylaxis or immunotherapy. Parenterally administered vaccines are more effective against pathogens that enter the body through systemic routes but are less effective in stimulating the immune system associated with mucous membranes, a non-invasive delivery route.

Mucosal DNA Vaccines

The respiratory, gastrointestinal and urogenital tracts are covered by mucosal surfaces, represent the main portal of entry of pathogens and are protected by a large and highly specialized innate and adaptive mucosal immune system. As the majority of infections affect or start at mucosal surfaces, eliciting a mucosal immune response can prevent the infectious agents from attaching and colonizing the mucosal epithelium (non-invasive bacteria), or from penetrating and replicating in the mucosa (viruses and invasive bacteria) and/or block microbial toxins to bind to and affect epithelial and other target cells [48].

The preferred mucosal routes for vaccination purposes are the vaginal [49], intranasal [50] and oral mucosae [51]. However, potent adjuvants are required to augment the effects of plasmid vaccines in humans, especially if these are delivered in small amounts, as is the case of intranasal delivery [50].

Initial infections are prevented through the action of secretory IgA (S-IgA) antibodies, the receptor-mediated endocytotic activity and antigen presentation by phagocytic cells [52]; protection after infection is based on activation of CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes, which are the major effect or cells of the mucosal immune system [52]. In this regard, many vaccines have already focused on improving the mucosal delivery systems to elicit both effective systemic cellular and humoral immune responses [53] [54].

Sites of the gut-associated lymphoid tissue (GALT), such as Peyer's patches (PPs) and isolated lymphoid follicles in draining gut mesenteric lymph nodes (MLNs), are more accessible to antigens and bacteria present in the luminal compartment than other sites of the mucosa. Moreover, specialized antigen sampling cells, such as M cells in the GALT, are capable of taking up particulate antigens and specific binding proteins by endocytosis and transport them to the underlying immune cells. DCs residing in the subepithelial dome region of the lymphoid follicles are then activated by contact with microbial antigens and migrate to the GALT, where they prime T cell responses [55].

Lymphocytes involved in intestinal immune responses are found in organized immune inductive sites of the GALT [56], where the largest number is concentrated in B- and T-cell zones. B-cell zones contain germinal centers believed to be the sites of isotype switching to IgA production and affinity maturation while T-cell zones contain large numbers of APCs such as DCs and macrophages [57] [58].

On the other hand, PP facilitate induction of mucosal immunity, with antigen stimulated B- and T-cells able to migrate to the systemic blood supply via the lymph to be seeded back to mucosal sites around the body [58] [59]. This enables communication between mucosal surfaces of the body [57].

The efficacy of DNA vaccines delivery by M cells depends on whether the administered agents can survive the gastric and intestinal environments, including pH-induced degradation, enzymes and diffusion across the mucus layers, and whether residence time in the intestine is long enough for sufficient interaction with target cells so that these can endocytose the vaccines. Therefore, oral administration of vaccines often requires delivery systems that can provide protection against enzymatic degradation and elimination in the gastrointestinal tract in order to maintain high bioavailability [60]. However, results of experimental approaches have proven difficult to induce strong intestinal immune responses as a single and naked oral administration of a DNA vaccine is usually not enough to achieve an immune response; development of effective mucosal delivery systems remains an active area of research.

Biological parameters that characterize a DNA vaccine's effectiveness have already been elucidated, although the exact mechanisms by which DNA vaccines produce antigen-specific immunity *in vivo* still require further studies. In addition, in many human clinical trials, the immune response has not been as effective as that seen in

non-human models and strategies to improve the immune response to plasmid DNA vaccines are under study [61].

5. How to Improve Immunogenicity of DNA Vaccines?

The vaccination process of DNA vaccines is directly related to their ability to induce protective immunity, considering that the induction of strong cellular and humoral immune responses is essential in eukaryotes. Many aspects, such as antigen expression and especially vector design, have great influence in the immunogenicity and efficacy of DNA vaccines and should be taken into consideration. In this regard, in an attempt to improve DNA vaccines, optimization of the following tools should be addressed: 1) plasmid DNA vectors, 2) transgene sequence, 3) co-expression of stimulatory sequences, 4) vector delivery system, and 5) targeting of the vector for appropriate immune stimulation.

5.1. Codon Usage

One of the problems to reach optimal levels of expression of the foreign genes of interest by DNA vaccine expression vectors in mammalian cells is the notable differences that are found among the codon usage of different pathogenic organisms and mammals. As such, codon optimization could be an efficient alternative to enhance the expression and immunogenicity of the transgene in mammalian cells, suiting the sequence to host codon bias based on generally available transfer RNA (tRNA) levels without altering the original amino acid sequence of the protein. It has been experimentally documented that common codons increase the translational rates of the expressed target gene compared with the use of rare codons, and the relative frequency of use of each codon depends and varies between species [62] [63].

Several approaches using the strategy of codon usage optimization have been successful in increasing protein translation rates and inducing efficient immune responses. Optimization of codon usage in mice influences the effects of DNA vaccines, enhancing translation efficiency and effective immune responses against intracellular bacteria such as *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium tuberculosis* [64]. Pulsawat and coworkers showed that codon optimization of *Dermatophagoides pteronyssinus* group 1 allergen improved its expression *in vitro* and induced an allergen-specific Th1 response in mice, representing a promising hypoallergenic DNA vaccine candidate for immunotherapy against house dust mite allergy [65].

Messenger RNA (mRNA) optimization is also an essential step for achieving larger expression of the sequence of interest. Besides, the large number of C-G rich sequences in the mRNA translation of the protein can be inhibited as an increase in the formation of secondary structures and the presence of pre-mRNA processing sites are capable of causing aberrant expression of the sequence of interest [66].

5.2. Customization of Antigenic Sequence

Candidate genes for a DNA vaccine construction for prophylactic uses are usually molecules associated with pathogenicity and/or virulence of infectious agents that are commonly modified to target proteins to different cellular locations, cytoplasm, cell wall or extracellular medium, since the expression of proteins in different compartments can influence the immunological response. Moreover, targeting antigens of interest to proteasomes or endosomes, using ubiquitin fusions, can also increase the number of peptides available to ligate to the major histocompatibility complex of class I (MCH-I) when induction of CTLs is required. Often, when it is necessary to express more than one gene of interest to trigger a protective immune response, polycistronic expression systems or even molten epitopes expressed as a unique polypeptide can be used [27].

5.3. CpG Motifs

Immune stimulatory sequences, called unmethylated phosphodiester linked cytosine and guanine (CpG) motifs, act through the Toll-like receptor 9 (TLR-9) to induce a series of immune stimulatory cytokines that lead to the activation of B-cells, monocytes, macrophages, dendritic cells (DCs) and natural killer (NK) cells, enhancing both non-specific and antigen-specific responses [67]. Cells are able to discriminate between endogenous and exogenous DNA based on these motifs, being these sequences practically absent in human cells, presenting, thus, adjuvant properties in DNA vaccines [68].

5.4. Untranslated Regions (UTRs)

UTRs are also responsible for regulating genetic expression through elements placed at the 5' and 3' ends of the translating sequence. Enhancer elements (boosters) and trans-activators of transcription can increase the activity of the promoter when placed at the 5' or 3' end of the gene. Some studied trans-activators have viral origin, such as the regulatory regions that act as transcriptional and post-transcriptional boosters [69]. So, the addition of leader sequences or 5'-UTR before the gene sequence can increase the stability of mRNA and contribute to larger translation efficiency.

5.5. Adjuvants

It has been demonstrated that co-injection of immune modulatory plasmids constitutes a promising strategy to improve the efficiency of DNA vaccines. These plasmids code for cytokines, such as interleukins, interferons, stimulatory colony factors and tumoralnecrose factors, chemokines and costimulatory molecules, with the objective of increasing the quantity and potential of APCs without the adverse effects of cytokine administration in the form of purified proteins. Tests performed in monkeys with a DNA vaccine in development against HIV-1 demonstrated that co-administration of a plasmid codifying IL-12 and IL-15 increased the cellular and humoral immunity [70].

Another way to increase the immunogenicity of vaccines could include the use of mixed vaccines, where the first dose would have a specific formulation and the second dose, the booster, a different one [71]. Prime-boost vaccines, including DNA, can elicit immune responses that differ in magnitude, quality and balance of cellular and humoral responses from those elicited by single components and could thus provide further enhancement for DNA immunizations. It has already been reported that this prime-boost strategy increases the production of antibodies [46] [72]. This strategy has been widely applied in a large number of vaccines, including HIV [73]-[75], avian influenza virus [76], tuberculosis [71] [77] [78] and malaria [79], resulting in stronger immune responses.

5.6. Nuclear Targeting Sequences

DNA nuclear targeting sequences (DTS) are recognition sequences of endogenous DNA-binding proteins that are essential for the transport of proteins into the cell's nucleus. Considering this, optimizing the vector design by introducing DTS in the plasmid DNA can lead to an increased expression of the sequence of interest. It has been verified that specific virus sequences, such as that of the Simian Virus 40 (SV40), are capable of driving the bacterial plasmid to the nuclear compartment increasing the levels of gene expression, both *in vitro* [80]-[82] and *in vivo* [32] [83] [84]. The DTS of SV40 has 372 base pairs and contains ligation sites for several transcription factors that present nuclear localization signals and can transport the protein-plasmid complex through the nuclear pores using the nuclear import machinery of the host cell [80]. Moreover, there are also evidences of other existing sequences that act as DTS. Mesika and colleagues showed a 12-fold expression increase of the luciferase reporter protein when using plasmids in which repeated sequences of binding sites for the transcription factor NF- κ B were cloned [85]. Other groups demonstrated that when the oriP sequences from the Epstein-Barr virus or copies of the tet operator (tetO) were inserted into plasmids, these increased the nuclear import and expression of the reporter genes carried by them [86] [87].

6. DNA Delivery Systems

DNA vaccines can be administered by different systems and routes. The delivery of DNA molecules into mammalian cells is a valuable tool to take into account when designing a DNA vaccine. The potential of transfection methods is essential to modulate gene expression and efficient induction of immunological responses, and several different DNA delivery systems have been evaluated and explored to improve their transfection capacity and induction of immunological responses, mainly to humans and large animals. The efficiency of these delivery systems depends on several factors, such as cell type, cellular context (*in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*), transgene capacity and general safety.

It is essential that the gene delivery system does not present harmful side effects to the hosts. Currently, several different approaches are being used for gene delivery, being the approaches based on viral vectors or non-viral methods the most commonly used. While viral vectors remain the most common approach, non-viral approaches have become more popular, as the use of viral vectors can raise safety concerns, such as toxicity and

possible induction of strong immunogenic reaction; as such, other non-viral strategies have become an alternative. Non-viral methods include chemical, physical and biological methods that can deliver the DNA directly to the host cell cytoplasm (Table 3).

6.1. Virus Delivery Systems

It has become clear that there can be no single vector that is suitable for all applications. Viruses are simple and capable to infect host cells using the cell’s machinery to express the gene of interest and produce the antigen in its native form. Virus-based vectors harness the viral infection pathway but avoid the subsequent expression of viral genes that leads to replication and toxicity. Furthermore, these vectors can carry and express multiple antigens. An efficient viral vector has to be able to induce the multiple arms of the immune system and present safety issues.

At present, five main classes of clinically applicable viral vectors are derived from oncoretroviruses, lentiviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses (AAVs) and herpes simplex-1 viruses (HSV-1s). Each of these classes is characterized by a set of different properties that make it suitable for some applications and unsuitable for others. The only characteristic required by all vectors are the abilities to be reproducibly and stably propagated and purified to high titres, to mediate targeted delivery and to mediate gene delivery and transgene expression without inducing harmful side effects. The five main classes of viral vector can be categorized in two groups according to whether their genomes integrate into host cellular chromatin (oncoretroviruses and lentiviruses) or persist in the cell nucleus, predominantly as extra-chromosomal episomes (AAVs, adenoviruses and herpes virus). Due to safety concerns, the replication-defective viruses are most utilized in clinical trials. Although viral vectors have been widely used, their principal inconvenience is that they may cause genetic diseases or favor the development of cancerous cells. Moreover, severe adverse effects were observed during two independent gene therapy trials, raising serious safety concerns about the use of viral vectors [88] [89].

The virus classes most widely used for gene therapy applications in clinical trials are Oncoretrovirus vectors. A limitation to the usefulness of C-type retrovirus vectors is that they can only gain access to the cell nucleus if the nuclear membrane breaks down; therefore, they can only transduce dividing cells. Lentivirus vectors on the other hand can naturally penetrate an intact nuclear membrane and transduce non-dividing cells. These vectors have proven to be effective tools for gene delivery to the central nervous system, generating long-term gene expression in the absence of inflammation [90]. Adenovirus vectors are the most efficient class of vector in terms of delivery to the cell nucleus and due to recent improvements that reduce the immunogenicity they have enhanced their prospects for long-term gene transfer in a wide range of different tissues. However, production of

Table 3. Main DNA vaccine delivery systems.

	Viral Vectors		Non-Viral Vectors			
			Chemical	Physical		Biological
			Liposomes	Electroporation	Gene Gun	Bacteria
Characteristic	<ul style="list-style-type: none"> • Can express multiples antigens • Induces strong immune responses • Potential reversion of the virus to its wild type form • Risk of integration of the transgene in the host’s genome 	<ul style="list-style-type: none"> • Synthetic vesicles of phospholipids bilayers containing DNA vaccine plasmids • Very safe system 	<ul style="list-style-type: none"> • Electric field pulse into the tissue so that it captures the DNA vaccine by means of transient pores in cells • Rapid, simple and efficient method • The cell membrane can be irreparably damaged with high voltages 	<ul style="list-style-type: none"> • Delivery of gold microparticles coated with DNA vaccine plasmids • Small amounts of DNA are necessary • High antibody production • Suboptimal transfection efficiency • Tissue damage from pressure • blast 	<ul style="list-style-type: none"> • Internalization of bacteria harboring the vaccine vector by target cells • Cell factories for large DNA plasmid production • Protect the DNA from degradation by nucleases • Amplification steps and purification of plasmid are not required, thereby reducing costs • Potential risk of chromosomal integration • Limited by their inefficiency • Potential induction of tolerance to the immunizing antigen 	

these viruses is very laborious. Regarding safe long-term gene transfer and expression in non-proliferating tissues, recombinant AAV vectors are the most promising vector system. The small size and simplicity of the vector particle makes it possible to administer high doses of vector systemically without eliciting acute inflammatory responses or toxic side effects. In contrast, HSV-1 is the largest virus and has therefore the capacity to carry large fragments of foreign DNA [89]. However, major limitations of these vectors are their cytopathic effect and the induction of an immune response by viral gene expression [91].

Several viral vectors have already been evaluated for their capability as immunization systems in human clinical trials. The replication-defective recombinant adenovirus serotype 5 (rAd5) vector was used as a HIV-1 vaccine candidate and showed to induce antigen—specific T cell responses while showing its safety and immunogenicity [92] [93]. A recombinant baculovirus bearing human endogenous retrovirus (HERV) envelope protein used as a carrier for a human papillomavirus (HPV-16L1) DNA vaccine (AcHERV-HP16L1) was developed and results in mice showed that this viral delivery system is more advantageous than Gardasil, the current prophylactic vaccine commercialized against HPV, showing higher cellular immunogenicity, considerably lower production cost and comparable safety [94].

Overall, viral vectors represent one of the most efficient vehicles for gene transfer into most tissues; however, these systems have important disadvantages that include the induction of innate immune responses, possible reversion to the wild type form of the virus, risk of integration of the transgene into the host's genome and human preexisting immunity against viral vectors. Several obstacles still have to be overcome and approaches are still on their way to find the standards for an ideal viral delivery system that will include the targeting of specific populations of cells in a target tissue and expressing therapeutic levels of transgene expression in a safe and regulated manner for the appropriate length of time.

6.2. Non-Viral Delivery Systems

6.2.1. Naked DNA Delivery

Naked DNA plasmid transfection is a simple and direct method, free of complex formulations or from agents, to transfer *in vivo* DNA gene sequences of interest. Several naked DNA vaccines have already been tested for some diseases: herpes simplex virus type 1, leishmaniosis, malaria, HIV and different types of cancer. However, to achieve significant levels of immunity in humans and large animals, DNA delivery methods often require very high doses of plasmids and multiple boosts [42] [95] [96]; thus, increasing the efficiency of DNA vaccines in humans is still required.

Animals immunized intranasally with a combination of DNA plasmids of a multiclade/multigene HIV-1 formulated with a lipid adjuvant showed significantly higher IgA levels in fecal pellets, while an enhancement of IgG systemic responses were observed both when the DNA was delivered mucosally and into the muscle. Animals immunized with plasmid DNA alone (naked) did not develop measurable vaccine specific systemic IgG responses and very low or no mucosal humoral responses [50].

Another study to understand the details of DNA vaccine delivery *in vivo* used naked plasmid or polymer/DNA complexes injected intradermally into mice. When analyzing the transgene expression (luciferase) and the local tissue distribution of the plasmid DNA, comparable number of luciferase expressing cells were observed in the skin of mice that had received the naked plasmid or polyplexes one day after transfection; however, naked plasmid levels dropped below detection limit after 24 h, whereas polyplexes persisted for up to 2 weeks, revealing that naked plasmid disperse quickly in the skin of mice after injection [97]. This emphasizes the importance of using a potent delivery system and an effective formulation for efficient plasmid immunization.

Insufficient cell membrane permeability and low cellular uptake of DNA plasmid vectors contribute for a decreased protein expression and consequently for a reduction of DNA vaccine effectiveness. Toxicity and non-efficient delivery systems also represent an obstacle for DNA vaccine development. Therefore, alternative potent transfection methods must be improved and developed [49]. The potential of genetic immunization is obvious and the efficiency of the DNA delivery method to reach the target tissue is highly important for the success of clinical trials. Naked DNA vaccines still require an improvement in their delivery to boost better immune responses and protect against diseases.

6.2.2. Physical Delivery Approaches

Physical approaches are the simplest ways to transfer DNA into a cell as they use a physical force to permeate

the cell membrane and allow intracellular gene transfer. However, physical approaches have to consider two important factors for the development of DNA delivery systems: the entry of DNA of interest in the target cells and its transport through the plasma membrane. Physical delivery methods show several advantages over other, such as the requirement of small amounts of DNA, direct bombardment of the DNA into cells, high transfection efficiency, high immunogenicity and high antibody production.

From out these approaches we can highlight gene gun, which is a ballistic needle free DNA delivery method that promotes cellular transfection by the bombardment of gold micro particles coated with specific DNA vaccine plasmids. Gene gun was originally developed for plant tissue transfections, but it also showed to be efficient to transfect animal and human cells and to induce cellular and humoral immunity in murine [98]-[100] and human hosts [101]. Nevertheless, gene gun also presents the drawbacks of suboptimal transfection conditions and possible tissue damage from pressure blast [102] [103].

Electroporation represents another physical delivery method and which is an electrically mediated injection technique that induces the permeabilization of the plasma membrane creating pores and allowing the introduction of plasmids containing foreign genes into the cells, which will subsequently express the desired genes. The reclosing of the cell membrane occurs naturally; however, the cell membrane can irreparably be damaged when high voltages are applied [104] [105]. Electroporation is a rapid, simple and efficient method widely used for the delivery of DNA, membrane protein insertion and other macromolecules into various types of cells, with numerous applications in the medical field and conventional biological laboratories [105]. Various complex extra- and intra-cellular factors can affect cell viability, such as the intracellular solute concentration, the electrical charge and the neighboring cells. Current studies have focused on the improvement of DNA molecules transport across the plasma membrane of the cell to optimize electrically mediated gene delivery [106].

6.2.3. Chemical Delivery Approaches

Chemical approaches use synthetic or naturally occurring compounds as carriers for gene delivery. These systems seem to be very safe and quite efficient. The most studied strategy uses cationic polymers and cationic lipids which transfers the DNA to the cells through intracellular vesicles, from which a small fraction of the DNA is released into the cytoplasm and migrates into the nucleus, where the transgene expression occurs.

Liposomes are synthetic vesicles consisting of phospholipid bilayers and represent one of the major techniques used for gene delivery into cells nowadays. A large number of cationic lipids with different molar ratios, such as derivate of diacylglycerol, lipids, polyamines and cholesterol, make the generation of different kinds of liposomes, possessing different physicochemical characteristics like size and net surface charge, possible [107]. Upon mixing with cationic liposomes, plasmid DNA is condensed into lipoplexes that trigger cellular uptake and facilitate the release of DNA from intracellular vesicles. The transfection efficiency of lipoplexes is affected by a great number of factors that include the chemical structure of the cationic lipid, the charge ratio between the cationic lipid and the DNA, the total amount of lipoplexes applied and the cell type.

Different types and configurations of cationic polymers have been explored and are widely used as carriers for both *in vitro* and *in vivo* gene delivery. An example of a commonly used cationic polymer for gene delivery is Polyethylenimine (PEI) [108], which requires condensation of the DNA with cationic polymers and the formation of PEI/DNA complexes [109]. This PEI/DNA complex is then taken up by the cell into acidified endosomal compartments and released into the cytoplasm where it finally reaches the nucleus [110] [111]. Different molecular sizes, commonly 800kDa (PEI800) and 22kDa (PEI22), or structures, linear or branched, of PEI have already been described. A study showed that this variability could have a direct effect on the transfection efficiency both *in vitro* and *in vivo*. The use of this polymer for DNA delivery in DNA-based immunotherapy or vaccination shows protective action by eliciting strong immune response [112]-[114].

6.2.4. Biological Approaches: Bacteria as DNA Vaccine Delivery System

Development of effective strategies for the delivery of DNA vaccines to mucosal tissues has received considerable attention over the past decade, as well as the use of recombinant bacteria as carrier systems. Live recombinant bacteria and attenuated bacterial pathogens appear to be attractive and promising vehicles for vaccine delivery and to induce both humoral and cellular immune responses [115].

Several bacterial species are capable of transferring vaccine plasmids to mammalian host cells and are considered cell factories that can produce large amounts of DNA plasmids. In 1980, Walter Schaffner observed, for the first time, gene transfer from bacteria to mammalian cells when tandem copies of the SV40 virus genome,

carried by *E. coli* laboratory strains, were transferred into co-cultured mammalian cells [116].

Bacterial DNA vaccine delivery systems consist in the internalization of bacteria, harboring a plasmid vector containing the sequence of the gene of interest, by target cells. Subsequent primary vesicle are formed and then fused to lysosomal compartments where lysis of bacteria occurs, releasing the plasmid DNA into the host's cytosol. The plasmid DNA then migrates to the nucleus of the cell where the gene sequence of interest is transcribed for subsequent transduction and protein synthesis by the host's cells machinery [117] [118].

The use of bacteria as vehicles for the delivery of DNA vaccines has several advantages when compared to other methods, such as naked DNA vaccination and viral carriers. Bacteria deliver DNA vaccine plasmids directly into the interior of the cells protecting the DNA from degradation by nucleases. Moreover, bacterial vehicles also act as natural antigens after host cell invasion, due to the presence of molecular markers associated to pathogens (PAMPs) that are capable of modulating the innate immune response and promote a robust and lasting adaptive response [119].

Bacterial carrier strains are easy to manufacture and allow for the maintenance of plasmids with high cloning capacity. Stable replication of vaccine plasmids by different bacterial carrier species can be further ensured by introducing bacterial genes, essential for survival or virulence within the host, into the vaccine plasmids and, thereby, circumventing the need to co-administrate plasmid selection markers [120]. Furthermore, in contrast to immunization with naked plasmid DNA or other delivery methods, no further plasmid amplification and purification steps are required, reducing thereby costs and labor extensively. Moreover, most bacterial carriers allow for mucosal immunization via oral route, show natural tropism for inductive sites of the immune system and provide danger signals which lead to a more efficient activation of the immune system as compared to immunization by naked DNA [118].

Currently, the most widely used bacteria for DNA delivery are intracellular attenuated pathogenic bacteria, such as *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* and *E. coli* [118]. In 1999, Fenelly and colleagues reported that an attenuated strain of *S. flexneri* carrying a DNA plasmid vaccine encoding different antigens of measles virus was able to induce, in intranasally immunized mice, a strong T_H1 type response and a lower amplitude T_H2 -type response [121]. Shata and Hone demonstrated that attenuated *S. flexneri* carrying a vaccine plasmid encoding the HIV-1 protein gp120 showed significant protection in mice against a challenge with a recombinant vaccinia virus-*env* vector, after intranasal vaccination [122]. Woo *et al.* (2001) and Zheng *et al.* (2001) evaluated, in a mouse model, the feasibility of *Salmonella typhimurium* delivering a plasmid-encoded HBV surface antigen at eliciting effective cellular immune responses. They concluded that the relatively absent humoral but strong cellular response could make this vaccine a potential therapeutic vaccine candidate for chronic HBV [123] [124].

In another work, a recombinant attenuated *L. monocytogenes* strain carrying plasmids for eukaryotic expression of the *Mycobacterium tuberculosis* Ag85 complex (Ag85A and Ag85B) and MPB/MPT51 molecules, showed the induction of specific protective cellular immunity against *M. tuberculosis*. A specific T_H1 cellular immune response following protective cellular immunity against an intravenous challenge with *M. tuberculosis* H37Rv, comparable to that caused by the conventional live BCG vaccine strain, was also observed [125].

However, these attenuated pathogenic bacteria present potential risk of reversion to their wild-type (virulent) phenotype, associated risk of infection and sensitive public opinion about their use as not being completely safe for human use, especially in children and immune compromised patients. Moreover, variation in the immunogenicity of the different attenuated strains has constituted a major problem and it has been difficult to reach the right balance between the level of attenuation (*i.e.*, lack of disease symptoms) and immunogenicity (*i.e.*, efficacy) [126].

In this regard, the use of non-pathogenic and food-grade bacteria, such as lactic acid bacteria (LAB), can represent an attractive alternative as vehicles for mucosal DNA delivery vaccines, since they are naturally present in foods and have long been consumed by humans, can be safely delivered at high doses and generate mucosal and systemic immune responses [127] [128].

Lactococcus lactis as DNA vaccines

Lactococcus lactis, the model LAB, has been widely used as vehicle for the delivery of exogenous antigens at mucosal level [127]. *L. lactis* is one of the most advanced prototypes of non-invasive, non-colonizing bacterial vaccine vehicles. Presenting the "GRAS" (Generally Recognized As Safe) status, *L. lactis* can be orally and intranasally administered, do not need further plasmid amplification neither purification steps [129], and some species of this group are capable of increasing the amount of IgA in the mucosa and stimulate the phagocytic

system of the host [54]. Moreover, LAB have little immunogenic activity and can be continuously used in immunization programs, do not present lipopolysaccharides (LPS) on their cellular wall, eliminating all possible risks of shock by endotoxin, and can be easily engineered to express multiple proteins and other molecules [127].

The use of *L. lactis* as microbial host for DNA delivery into mammalian cells has been evaluated as another promising DNA vaccination strategy [115] [130]-[132]. Delivery of DNA into mammalian cells was demonstrated by Guimarães and colleagues in 2006 using native *L. lactis* strains capable of delivering a plasmid (pLIG:BLG1) harboring the bovine β -lactoglobulin (BLG) gene, one of the major cow's milk allergen, under the transcriptional control of the viral promoter CMV. Production and secretion of BLG was observed in Caco-2 cells after incubation with *L. lactis* carrying the DNA plasmid vector, demonstrating that *L. lactis* is able to deliver BLG cDNA into mammalian epithelial cells *in vitro* [129]. After that, Chatel *et al.* showed that this *L. lactis* strain (pLIG:BLG1) orally administered to mice was also able to transfer the functional plasmid vector to mice's epithelial membranes of the small intestine and induce a low and transitory T_h1-type immune response [51].

In an approach to improve DNA vaccine delivery, wall weakening treatments in *L. lactis*, with glycine, penicillin or lysozyme, were used to promote the uptake of these bacteria by Caco-2 cells. Strains harboring a functional plasmid containing a reporter red fluorescent protein (RFP) gene were used *in vitro* for gene delivery and *L. lactis* strain NZ3900 treated with glycine showed a good gene transfer frequency. However, a mechanism by which treated bacteria could be efficiently internalized into Caco-2 cells has not yet been developed and could be an interesting strategy to avoid the use of virulent genes [131].

In another attempt to improve DNA delivery, an invasive *L. lactis* strain expressing internalin A (InIA), a cell wall-anchored protein and major invasin of *Listeria monocytogenes*, was constructed [133] [134]. InIA binds to an extracellular domain of E-cadherin, a transmembrane cell-to-cell adhesion molecule. It was demonstrated that this recombinant *L. lactis* could be successfully internalized by epithelial Caco-2 cells *in vitro* and by enterocytes *in vivo* after oral administration in guinea pigs. In addition, *L. lactis* InIA+ was able to deliver a vaccine vector expressing the green fluorescent protein (GFP) under the control of the CMV promoter and about 1% of Caco-2 cells expressed eGFP after co-culture with this strain [135]. However, it is important to note that *in vivo* experimental studies with *L. lactis* expressing the InIA+ are limited to guinea pigs or transgenic mice expressing human E-cadherin, as InIA only binds to human E-cadherin and does not interact with murine E-cadherin, limiting its experimental use in mouse models [136].

Thus, in the attempt of improving DNA delivery and increasing its use for a wider range of animal models, a new recombinant invasive *L. lactis* strain expressing the Fibronectin-Binding Protein A (FnBPA) of *Staphylococcus aureus* [137] was constructed [136]. FnBPA mediates adhesion to host tissue and bacterial uptake into phagocytic and non-phagocytic host cells, has many binding domains for fibronectin and a specific domain for fibrinogen. It was demonstrated that the invasive capacity and internalization of *L. lactis* FnBPA+ into Caco-2 cells was comparable to the observed in *L. lactis* InIA+ [136].

Recently, the *L. lactis* FnBPA + strain harbouring the pValac:BLG plasmid showed increased DNA plasmid transfer both *in vitro* and *in vivo*. This strain was capable of producing up to 30 times more BLG in Caco-2 cells than the non-invasive *L. lactis* p Valac:BLG strain and increased the number of mice producing BLG [132]. In order to avoid the use of this lactococci strain, De Azevedo *et al.* constructed a new *L. lactis* strain that produces a previously described mutated form of InIA (mInIA) and that allows binding to murine E-cadherin. The plasmid transfer *in vitro* using *L. lactis* mInIA + BLG increased 10 times compared to the wild type strain and the number of mice producing BLG in isolated enterocytes after oral administration was slightly higher [115].

All these approaches confirm the high potential of invasive recombinant lactococci strains as DNA delivery vector *in vivo*. Moreover, these strategies combine the advantages of mucosal immunization with the simplicity of the technique and low cost of DNA vaccines, as well as the secure use of these bacteria. In this context, the use of non-invasive and invasive *L. lactis* strains for the delivery of plasmids expressing molecules of interest could be a good, efficient, economical and safe strategy for the development of DNA vaccines for the control of a diverse array of diseases.

7. Approved DNA Vaccines

Four DNA vaccines have already been approved for veterinary use, being two of them prophylactic vaccines against infectious diseases, one for cancer immunotherapy and one for gene therapy (Table 4).

Table 4. DNA vaccines approved for veterinary use.

Type	Species	Target	Product/Company	License date/ country	Route of administration	Benefits
Prophylactic vaccine	Horses	West Nile Virus	West Nile-Innovator [®] / Fort Dodge Animal Health	2005 USA	IM ¹	Production of protective antibodies
Prophylactic vaccine	Salmon	Infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV)	Apex-IHN [®] /Novartis Animal Health	2005 Canada	IM	Stimulation of innate and adaptive immune responses improving the welfare and product yield
Immunotherapy of cancer	Dogs	Melanoma	Oncept [™] /Merial	2010 USA	ID ² needle-free.	Production of antibodies capable of preventing the progress of the disease and prolonging the animal's life
Gene therapy	Swine	Growth hormone releasing hormone (GHRH)	LifeTide [®] SW5/VGX [™] Animal Health	2008 Australia	IM followed by electroporation	Decrease in perinatal mortality and morbidity, increase of the number of pigs weaned per sow and productivity

In 2005, the West Nile Virus (WNV) equine DNA vaccine was licensed by the US Department of Agriculture (USDA). This vaccine contains two genes that encode WNV proteins. One advantage of this DNA vaccine is that vaccinated horses can be differentiated from those that have been naturally infected by the virus, which could be considered an important factor for public health disease monitoring activities [138] [139]. Also in 2005, the Canadian Food Inspection Agency (CFIA) licensed a DNA vaccine against the Infectious Haematopoietic Necrosis Virus. Produced by Novartis, this vaccine is commercially called Apex-IHN[®] and prevents infectious haematopoietic necrosis in farm-raised Atlantic salmon and is composed of a plasmid containing the gene for a glycoprotein of the virus, under the control of the pCMV promoter, and is able to stimulate innate and adaptive immune responses [17].

The first therapeutic vaccine for cancer treatment that was approved by the USDA is commercially called ONCEPT[™] (Merial). This vaccine is used for dogs affected by oral melanoma and is produced by the insertion of a non-canine gene for tyrosinase in a DNA plasmid. The tyrosine gene is present in tumour and normal cells, so no immune response against this antigen is formed. Human tyrosine is partially similar to the canine tyrosine; however, it is also partially recognized as a foreign antigen by the animal's organism and is then able to break the tolerance to this protein, inducing a strong immune response [140] [141]. A conditional license of this vaccine was available for veterinary oncologists and testing in 2007 and in 2010 it received full licensing.

Finally, a gene therapy developed for pigs demonstrated that animals that had received only one dose of the DNA plasmid were capable of expressing the natural form of the growth hormone releasing hormone (GHRH), being this result the same as that obtained for pigs that were treated with two doses of the injectable growth hormone (GH) daily during eight weeks. The injectable dose of the plasmid (pGHRH) administered through electroporation favoured the expression of GH. Approved in 2008 by the Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, pGHRH was the first licensed therapeutic plasmid administered via electroporation. Commercially called LifeTide[®] SW 5 (VGX Animal Health), this vaccine is administered in a single dose to females of reproductive age, reducing perinatal morbidity and mortality and increasing productivity [19] [20].

While some animal DNA vaccines are already being used, many human DNA vaccines are still being tested in clinical trials. Successfully tested vaccines in animal models opened the door to the development of human vaccines, using procedures approved by ethic committees. Testing DNA vaccines in clinical trials is important to obtain information about adverse effects, safety and efficacy of the vaccine and vaccination procedure. Clinical trials are composed of four sequential phases. In Phase I, the experimental vaccine is administered to a group of 20 - 80 people to evaluate the safety and proper dosing of the vaccine and identify its side effects. In Phase II the efficacy and safety are evaluated in a larger group of individuals (100 - 300), while in Phase III the vaccine is tested in an even larger group of people (1000 - 3000) and compared to conventional treatments, in order to provide information on their safe use, effectiveness and side effects. Finally, in Phase IV, post marketing studies de-

lineate additional information, including the drug's risks, benefits and optimal use (www.clinicaltrials.gov).

A HIV-1 vaccine clinical trial phase I study was performed in healthy HIV-1-uninfected adults using the PENNVAX[®]-B DNA vaccine (PV is a mixture of 3 expression plasmids encoding HIV-1 Clade B Env, Gag, and Pol) and a DNA plasmid expressing human interleukin 12 (IL-12). Cellular immune responses were analysed after four intramuscular vaccine administration or three intramuscular administrations by electroporation. This trial showed that this vaccine was safe and well tolerated by patients and that the administration of PV and IL-12 by electroporation had a significant dose-sparing effect and provided higher immunogenicity to that observed in the trial without electroporation, showing the power of combining DNA approaches to generate stronger immune responses in humans [142].

Sadly, until now no licensed human DNA vaccines exist, but the results obtained with the commercialized veterinary vaccines and the various human clinical trials that are under study are increasing the reliability of this vaccine platform, greatly raising hopes for the successful development of human vaccines and therapies. However, a lot of effort and work is still necessary to improve the different DNA vaccine platforms to certify their safety and immunological efficiency.

8. Conclusion

DNA vaccine is a simple concept with a complex mechanism of action that represents a feasible strategy for world health today. The proof of this is that four DNA vaccines that have proved to be efficient for prophylaxis against infectious diseases, cancer immunotherapy and gene therapy have already been approved for veterinary use. Till today, no available human DNA vaccines exist, but the results obtained with the already licensed animal vaccines increases their reliability and hopes for the development of DNA vaccines for human use. Therefore, strategies designed to improve genetic vaccination efficiency are nowadays the focus of current studies with DNA vaccines.

References

- [1] WHO (2008) The Global Burden of Disease: 2004 Update.
- [2] Kariuki, S. and Hart, C.A. (2001) Global Aspects of Antimicrobial-Resistant Enteric Bacteria. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **14**, 579-586. <http://dx.doi.org/10.1097/00001432-200110000-00012>
- [3] Threlfall, E.J. (2002) Antimicrobial Drug Resistance in Salmonella: Problems and Perspectives in Food- and Water-Borne Infections. *FEMS Microbiology Reviews*, **26**, 141-148. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00606.x>
- [4] van Ginkel, F.W., Nguyen, H.H. and McGhee, J.R. (2000) Vaccines for Mucosal Immunity to Combat Emerging Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, **6**, 123-132. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0602.000204>
- [5] Mielcarek, N., Alonso, S. and Locht, C. (2001) Nasal Vaccination Using Live Bacterial Vectors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **51**, 55-69.
- [6] Gurunathan, S., Wu, C.Y., Freidag, B.L. and Seder, R.A. (2000) DNA Vaccines: A Key for Inducing Long-Term Cellular Immunity. *Current Opinion in Immunology*, **12**, 442-447. [http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00118-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00118-7)
- [7] Levine, M.M. and Sztein, M.B. (2004) Vaccine Development Strategies for Improving Immunization: The Role of Modern Immunology. *Nature Immunology*, **5**, 460-464. <http://dx.doi.org/10.1038/ni0504-460>
- [8] Stasney, J., Cantarow, A. and Paschkis, K.E. (1950) Production of Neoplasms by Injection of Fractions of Mammalian Neoplasms. *Cancer Research*, **10**, 775-782.
- [9] Will, H., Cattaneo, R., Koch, H.G., Darai, G., Schaller, H., Schellekens, H., van Eerd, P.M. and Deinhardt, F. (1982) Cloned HBV DNA Causes Hepatitis in Chimpanzees. *Nature*, **299**, 740-742.
- [10] Dubensky, T.W., Campbell, B.A. and Villarreal, L.P. (1984) Direct Transfection of Viral and Plasmid DNA into the Liver or Spleen of Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**, 7529-7533. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.81.23.7529>
- [11] Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P.L. (1990) Direct Gene Transfer into Mouse Muscle *In Vivo*. *Science*, **247**, 1465-1468. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1690918>
- [12] Tang, D.C., DeVit, M. and Johnston, S.A. (1992) Genetic Immunization Is a Simple Method for Eliciting an Immune Response. *Nature*, **356**, 152-154. <http://dx.doi.org/10.1038/356152a0>
- [13] Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C., Robinson, H.L. (1993) DNA Vaccines: Protective Immunizations by Parenteral, Mucosal and Gene-Gun Inoculations. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, **90**, 11478-11482. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.24.11478>
- [14] Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M. and Friedman, A. (1993) Heterologous Protection against Influenza by Injection of DNA Encoding a Viral Protein. *Science*, **259**, 1745-1749. <http://dx.doi.org/10.1126/science.8456302>
- [15] Reyes-Sandoval, A. and Ertl, H.C. (2001) DNA Vaccines. *Current Molecular Medicine*, **1**, 217-243. <http://dx.doi.org/10.2174/1566524013363898>
- [16] Davidson, A.H., Traub-Dargatz, J.L., Rodeheaver, R.M., Ostlund, E.N., Pedersen, D.D., Moorhead, R.G., Stricklin, J.B., Dewell, R.D., Roach, S.D., Long, R.E., Albers, S.J., Callan, R.J. and Salman, M.D. (2005) Immunologic Responses to West Nile Virus in Vaccinated and Clinically Affected Horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **226**, 240-245. <http://dx.doi.org/10.2460/javma.2005.226.240>
- [17] Garver, K.A., LaPatra, S.E. and Kurath, G. (2005) Efficacy of an Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN) Virus DNA Vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and Sockeye *O. nerka* Salmon. *Diseases of Aquatic Organisms*, **64**, 13-22. <http://dx.doi.org/10.3354/dao064013>
- [18] Bergman, P.J., Camps-Palaua, M.A., McKnighta, J.A., Leibmana, N.F., Crafta, D.M., Leunga, C., Liaoa, J., Riviereb, I., Sadelaib, M., Hohenhaus, A.E., Gregorb, P., Houghtonb, A.N., Peralesb, M.A. and Wolchokb, J.D. (2006) Development of a Xenogeneic DNA Vaccine Program for Canine Malignant Melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine*, **24**, 4582-4585. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.027>
- [19] Khan, A.S., Bodles-Brakhop, A.M., Fiorotto, M.L. and Draghia-Akli, R. (2010) Effects of Maternal Plasmid GHRH Treatment on Offspring Growth. *Vaccine*, **28**, 1905-1910. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.093>
- [20] Khan, A.S., Draghia-Akli, R., Shypailo, R.J., Ellis, K.I., Mersmann, H. and Fiorotto, M.L. (2010) A Comparison of the Growth Responses Following Intramuscular GHRH Plasmid Administration versus Daily Growth Hormone Injections in Young Pigs. *Molecular Therapy*, **18**, 327-333. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2009.224>
- [21] Liu, M.A. (2010) DNA Vaccines: An Historical Perspective and View to the Future. *Immunological Reviews*, **239**, 62-84. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00980.x>
- [22] Glenting, J. and Wessels S. (2005) Ensuring Safety of DNA Vaccines. *Microbial Cell Factories*, **4**, 26. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-4-26>
- [23] Williams, J.A., Carnes, A.E. and Hodgson, C.P. (2009) Plasmid DNA Vaccine Vector Design: Impact on Efficacy, Safety and Upstream Production. *Biotechnology Advances*, **27**, 353-370. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.02.003>
- [24] Kowalczyk, D.W. and Ertl, H.C. (1999) Immune Responses to DNA Vaccines. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **55**, 751-770. <http://dx.doi.org/10.1007/s000180050330>
- [25] Garmory, H.S., Leckenby, M.W., Griffin, K.F., Elvin, S.J., Taylor, R.R., Hartley, M.G., Hanak, J.A., Williamson, E.D. and Cranenburgh, R.M. (2005) Antibiotic-Free Plasmid Stabilization by Operator-Repressor Titration for Vaccine Delivery by Using Live *Salmonella enteric* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, **73**, 11. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.4.2005-2011.2005>
- [26] Mairhofer, J., Pfaffenzeller, I., Merz, D. and Grabherr, R. (2007) A Novel Antibiotic Free Plasmid Selection System: Advances in Safe and Efficient DNA Therapy. *Biotechnology Journal*, **3**, 83-89. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.200700141>
- [27] Becker, P.D., Noerder, M. and Guzmán, C.A. (2008) Genetic Immunization: Bacteria as DNA Vaccine Delivery Vehicle. *Human Vaccines*, **4**, 189-202. <http://dx.doi.org/10.4161/hv.4.3.6314>
- [28] Papadakis, E.D., Nicklin, S.A., Baker, A.H. and White, S.J. (2004) Promoters and Control Elements: Designing Expression Cassettes for Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, **4**, 89-113.
- [29] Vanniasinkam, T., Reddy, S.T. and Ertl, H.C. (2006) DNA Immunization Using a Non-Viral Promoter. *Virology*, **344**, 412-420. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2005.08.040>
- [30] Shan, S., Jiang, Y., Bu, Z., Ellis, T., Zeng, X., Edwards, J., Tian, G., Li, Y., Ge, J., Chen, H. and Fenwick, S. (2011) Strategies for Improving the Efficacy of a H6 Subtype Avian Influenza DNA Vaccine in Chickens. *Journal of Virological Methods*, **173**, 220-226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.008>
- [31] Xu, Z.L., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mayumi, T. and Hayakawa, T. (2002) Strength Evaluation of Transcriptional Regulatory Elements for Transgene Expression by Adenovirus Vector. *Journal of Controlled Release*, **81**, 155-163. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00059-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00059-7)
- [32] Li, S., MacLaughlin, F.C., Fewell, J.G., Gondo, M., Wang, J., Nicol, F., Dean, D.A. and Smith, L.C. (2001) Muscle-Specific Enhancement of Gene Expression by Incorporation of SV40 Enhancer in the Expression Plasmid. *Gene Therapy*, **8**, 494-497. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3301419>
- [33] Shedlock, D.J. and Weiner, D.B. (2000) DNA Vaccination: Antigen Presentation and the Induction of Immunity.

Journal of Leukocyte Biology, **68**, 793-806.

- [34] Capone, S., Zampaglione, I., Vitelli, A., Pezzanera, M., Kierstead, L., Burns, J., Ruggeri, L., Arcuri, M., Cappelletti, M., Meola, A., Ercole, B.B., Tafi, R., Santini, C., Luzzago, A., Fu, T.M., Colloca, S., Ciliberto, G., Cortese, R., Nicosia, A., Fattori, E. and Folgori, A. (2006) Modulation of the Immune Response Induced by Gene Electrotransfer of a Hepatitis C Virus DNA Vaccine in Nonhuman Primates. *The Journal of Immunology*, **177**, 7462-7471.
- [35] Fioretti, D., Iurescia, S., Fazio, V.M. and Rinaldi, M. (2010) DNA Vaccines: Developing New Strategies against Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2010**, Article ID: 174378. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/174378>
- [36] Manam, S., Ledwith, B.J., Barnum, A.B., Troilo, P.J., Pauley, C.J., Harper, L.B., Griffiths, T.G., Niu, Z., Denisova, L., Follmer, T.T., Pacchione, S.J., Wang, Z., Beare, C.M., Bagdon, W.J. and Nichols, W.W. (2000) Plasmid DNA Vaccines: Tissue Distribution and Effects of DNA Sequence, Adjuvants and Delivery Method on Integration into Host DNA. *Intervirology*, **43**, 273-281. <http://dx.doi.org/10.1159/000053994>
- [37] Ledwith, B.J., Manam, S., Troilo, P.J., Barnum, A.B., Pauley, C.J., Griffiths, T.G., Harper, L.B., Beare, C.M., Bagdon, W.J. and Nichols, W.W. (2000) Plasmid DNA Vaccines: Investigation of Integration into Host Cellular DNA Following Intramuscular Injection in Mice. *Intervirology*, **43**, 258-272. <http://dx.doi.org/10.1159/000053993>
- [38] Pal, R., Yu, Q., Wang, S., Kalyanaraman, V.S., Nair, B.C., Hudacik, L., Whitney, S., Keen, T., Hung, C.L., Hocker, L., Kennedy, J.S., Markham, P. and Lu, S. (2006) Definitive Toxicology and Biodistribution Study of a Polyvalent DNA Prime/Protein Boost Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Vaccine in Rabbits. *Vaccine*, **24**, 1225-1234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.07.112>
- [39] Sheets, R.L., Stein, J., Manetz, T.S., Duffy, C., Nason, M., Andrews, C., Kong, W.P., Nabel, G.J. and Gomez, P.L. (2006) Biodistribution of DNA Plasmid Vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile Virus Is Similar, without Integration, Despite Differing Plasmid Backbones or Gene Inserts. *Toxicological Sciences*, **91**, 610-619. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfj169>
- [40] Bagarazzi, M.L., Boyer, J.D., Javadian, M.A., Chattergoon, M., Dang, K., Kim, G., Shah, J., Wang, B. and Weiner, D.B. (1997) Safety and Immunogenicity of Intramuscular and Intravaginal Delivery of HIV-1 DNA Constructs to Infant Chimpanzees. *Journal of Medical Primatology*, **26**, 27-33. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0684.1997.tb00316.x>
- [41] MacGregor, R.R., Boyer, J.D., Ugen, K.E., Lacy, K.E., Gluckman, S.J., Bagarazzi, M.L., Chattergoon, M.A., Baine, Y., Higgins, T.J., Ciccarelli, R.B., Coney, L.R., Ginsberg, R.S. and Weiner, D.B. (1998) First Human Trial of a DNA-Based Vaccine for Treatment of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Safety and Host Response. *The Journal of Infectious Diseases*, **178**, 92-100. <http://dx.doi.org/10.1086/515613>
- [42] Le, T.P., Coonan, K.M., Hedstrom, R.C., Charoenvit, Y., Sedegah, M., Epstein, J.E., Kumar, S., Wang, R., Doolan, D. L., Maguire, J.D., Parker, S.E., Hobart, P., Norman, J. and Hoffman, S.L. (2000) Safety, Tolerability and Humoral Immune Responses after Intramuscular Administration of a Malaria DNA Vaccine to Healthy Adult Volunteers. *Vaccine*, **18**, 1893-1901. [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00407-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00407-7)
- [43] Vaughan, E.E. and Dean, D.A. (2006) Intracellular Trafficking of Plasmids during Transfection Is Mediated by Microtubules. *Molecular Therapy*, **13**, 422-428. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.10.004>
- [44] Payette, P.J., Weeratna, R.D., McCluskie, M.J. and Davis, H.L. (2001) Immune-Mediated Destruction of Transfected Myocytes Following DNA Vaccination Occurs via Multiple Mechanisms. *Gene Therapy*, **8**, 1395-1400. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3301534>
- [45] You, Z., Huang, X., Hester, J., Toh, H.C. and Chen, S.Y. (2001) Targeting Dendritic Cells to Enhance DNA Vaccine Potency. *Cancer Research*, **61**, 3704-3711.
- [46] Doria-Rose, N.A. and Haigwood, N.L. (2003) DNA Vaccine Strategies: Candidates for Immune Modulation and Immunization Regimens. *Methods*, **31**, 207-216. [http://dx.doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00135-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00135-X)
- [47] Cherif, M.S., Shuaibu, M.N., Kurosaki, T., Helegbe, G.K., Kikuchi, M., Yanagi, T., Tsuboi, T., Sasaki, H. and Hirayama, K. (2011) Immunogenicity of Novel Nanoparticle-Coated MSP-1 C-Terminus Malaria DNA Vaccine Using Different Routes of Administration. *Vaccine*, **29**, 9038-9050. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.031>
- [48] Holmgren, J. and Czerkinsky, C. (2005) Mucosal Immunity and Vaccines. *Nature Medicine*, **11**, S45-S53. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1213>
- [49] Kanazawa, T., Takashima, Y., Hirayama, S. and Okada, H. (2008) Effects of Menstrual Cycle on Gene Transfection through Mouse Vagina for DNA Vaccine. *International Journal of Pharmaceutics*, **360**, 164-170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.038>
- [50] Brave, A., Hallengard, D., Schroder, U., Blomberg, P., Wahren, B. and Hinkula, J. (2008) Intranasal Immunization of Young Mice with a Multigene HIV-1 Vaccine in Combination with the N3 Adjuvant Induces Mucosal and Systemic Immune Responses. *Vaccine*, **26**, 5075-5078. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.066>
- [51] Chatel, J.M., Pothelune, L., Ah-Leung, S., Corthier, G., Wal, J.M. and Langella, P. (2008) *In Vivo* Transfer of Plasmid from Food-Grade Transiting Lactococci to Murine Epithelial Cells. *Gene Therapy*, **15**, 1184-1190.

- [52] Heystek, H.C., Moulon, C., Woltman, A.M., Garonne, P. and van Kooten, C. (2002) Human Immature Dendritic Cells Efficiently Bind and Take Up Secretory IgA without the Induction of Maturation. *The Journal of Immunology*, **168**, 102-107.
- [53] Lavelle, E.C. and O'Hagan, D.T. (2006) Delivery Systems and Adjuvants for Oral Vaccines. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **3**, 747-762. <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.3.6.747>
- [54] Neutra, M.R. and Kozlowski, P.A. (2006) Mucosal Vaccines: The Promise and the Challenge. *Nature Reviews Immunology*, **6**, 148-158. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1777>
- [55] Wells, J. (2011) Mucosal Vaccination and Therapy with Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Annual Review of Food Science and Technology*, **2**, 423-445. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133640>
- [56] Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R. and Russell, M.W. (2008) Terminology: Nomenclature of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Mucosal Immunology*, **1**, 31-37. <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2007.9>
- [57] Kaiserlian, D. and Etchart, N. (1999) Entry Sites for Oral Vaccines and Drugs: A Role for M Cells, Enterocytes and Dendritic Cells? *Seminars in Immunology*, **11**, 217-224. <http://dx.doi.org/10.1006/smim.1999.0177>
- [58] Shalaby, W.S. (1995) Development of Oral Vaccines to Stimulate Mucosal and Systemic Immunity: Barriers and Novel Strategies. *Clinical Immunology and Immunopathology*, **74**, 127-134. <http://dx.doi.org/10.1006/clin.1995.1019>
- [59] Brandtzaeg, P., Farstad, I.N., Haraldsen, G. and Jahnsen, F.L. (1998) Cellular and Molecular Mechanisms for Induction of Mucosal Immunity. *Developments in Biological Standardization*, **92**, 93-108.
- [60] Chadwick, S., Kriegel, C. and Amiji, M. (2009) Delivery Strategies to Enhance Mucosal Vaccination. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **9**, 427-440. <http://dx.doi.org/10.1517/14712590902849224>
- [61] Calarota, S.A. and Weiner, D.B. (2004) Enhancement of Human Immunodeficiency Virus Type 1-DNA Vaccine Potency through Incorporation of T-Helper 1 Molecular Adjuvants. *Immunological Reviews*, **199**, 84-99. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00150.x>
- [62] Kim, M.S. and Sin, J.I. (2005) Both Antigen Optimization and Lysosomal Targeting Are Required for Enhanced Anti-Tumour Protective Immunity in a Human Papillomavirus E7-Expressing Animal Tumour Model. *Immunology*, **116**, 255-266. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02219.x>
- [63] Li, K.B., Zhang, X.G., Ma, J., Jia, X.J., Wang, M., Dong, J., Zhang, X.M., Xu, H. and Shu, Y.L. (2008) Codon Optimization of the H5N1 Influenza Virus HA Gene Gets High Expression in Mammalian Cells. *Chinese Journal of Virology*, **24**, 101-105.
- [64] Uchijima, M., Yoshida, A., Nagata, T. and Koide, Y. (1998) Class I-Restricted T Cell Responses against Vaccine Is Required for the Effective MHC Optimization of Codon Usage of Plasmid DNA an Intracellular Bacterium. *The Journal of Immunology*, **161**, 5594-5599.
- [65] Pulsawat, P., Piboonpocanun, S., Sirivichayakul, S., Buranapraditkun, S., Jacquet, A., Shimada, M., Okuda, K. and Ruxrungtham, K.J. (2010) Production and Immunogenicity of Hypoallergenic Codon-Optimized DNA Vaccine encoding Mature Der p 1 Allergen. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, **20**, 582-590.
- [66] Besse, F. and Ephrussi, A. (2008) Translational Control of Localized mRNAs: Restricting Protein Synthesis in Space and Time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**, 971-980. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2548>
- [67] Kumagai, Y., Takeuchi, O. and Akira, S. (2008) TLR9 as a Key Receptor for the Recognition of DNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**, 795-804. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.12.004>
- [68] Angel, J.B., Cooper, C.L., Clinch, J., Young, C.D., Chenier, A., Parato, K.G., Lautru, M., Davis, H. and Cameron, D.W. (2008) CpG Increases Vaccine Antigen-Specific Cell-Mediated Immunity When Administered with Hepatitis B vaccine In HIV Infection. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines*, **6**, 4. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-8518-6-4>
- [69] Xu, Z.L., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mayumi, T. and Hayakawa, T. (2001) Optimization of Transcriptional Regulatory Elements for Constructing Plasmid Vectors. *Gene*, **272**, 149-156. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00550-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00550-9)
- [70] Chong, S.Y., Egan, M.A., Kutzler, M.A., Megati, S., Masood, A., Roopchard, V., Garcia-Hand, D., Montefiori, D.C., Quiroz, J., Rosati, M., Schadeck, E.B., Boyer, J.D., Pavlakis, G.N., Weiner, D.B., Sidhu, M., Eldridge, J.H. and Israel, Z.R. (2007) Comparative Ability of Plasmid IL-12 and IL-15 to Enhance Cellular and Humoral Immune Responses Elicited by a SIVgag Plasmid DNA Vaccine and Alter Disease Progression Following SHIV(89.6P) Challenge in Rhesus Macaques. *Vaccine*, **25**, 4967-4982. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.070>
- [71] Wang, Q.M., Sun, S.H., Hu, Z.L., Yin, M., Xiao, C.J. and Zhang, J.C. (2004) Improved Immunogenicity of a Tuberculosis DNA Vaccine Encoding ESAT6 by DNA Priming and Protein Boosting. *Vaccine*, **22**, 3622-3627. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.029>
- [72] Reyes-Sandoval, A. and Ertl, H.C. (2001) DNA Vaccines. *Current Molecular Medicine*, **1**, 217-243.

- <http://dx.doi.org/10.2174/1566524013363898>
- [73] Dale, C.J., Thomson, S., De Rose, R., Ranasinghe, C., Medveczky, C.J., Pamungkas, J., Boyle, D.B., Ramshaw, I.A. and Kent, S.J. (2006) Prime-Boost Strategies in DNA Vaccines. *Methods in Molecular Medicine*, **127**, 171-197.
- [74] Kent, S., De Rose, R. and Rollman, E. (2007) Drug Evaluation: DNA/MVA Prime-Boost HIV Vaccine. *Current Opinion in Investigational Drugs*, **8**, 159-167.
- [75] Patterson, L.J. and Robert-Guroff, M. (2008) Replicating Adenovirus Vector Prime/Protein Boost Strategies for HIV Vaccine Development. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **8**, 1347-1363.
<http://dx.doi.org/10.1517/14712598.8.9.1347>
- [76] Pan, Z., Zhang, X., Geng, S., Cheng, N., Sun, L., Liu, B., Huang, J. and Jiao, X. (2009) Priming with a DNA Vaccine Delivered by Attenuated *Salmonella typhimurium* and Boosting with a Killed Vaccine Confers Protection of Chickens against Infection with the H9 Subtype of Avian Influenza Virus. *Vaccine*, **27**, 1018-1023.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.111>
- [77] Fan, X., Gao, Q. and Fu, R. (2007) DNA Vaccine Encoding ESAT-6 Enhances the Protective Efficacy of BCG against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice. *Scandinavian Journal of Immunology*, **66**, 523-528.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.02006.x>
- [78] Lu, J., Wang, C., Zhou, Z., Ying Zhang, Cao, T., Shi, C., Chen, Z., Chen, L., Cai, C. and Fan, X. (2011) Immunogenicity and Protective Efficacy against Murine Tuberculosis of a Prime-Boost Regimen with BCG and a DNA Vaccine Expressing ESAT-6 and Ag85A Fusion Protein. *Clinical and Developmental Immunology*, **2011**, Article ID: 617892.
<http://dx.doi.org/10.1155/2011/617892>
- [79] Moore, A.C. and Hill, A.V. (2004) Progress in DNA-Based Heterologous Prime-Boost Immunization Strategies for Malaria. *Immunological Reviews*, **199**, 126-143. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00138.x>
- [80] Dean, D.A. (1997) Import of Plasmid DNA into the Nucleus Is Sequence Specific. *Experimental Cell Research*, **230**, 293-302. <http://dx.doi.org/10.1006/excr.1996.3427>
- [81] Dean, D.A., Dean, B.S., Muller, S. and Smith, L.C. (1999) Sequence Requirements for Plasmid Nuclear Import. *Experimental Cell Research*, **253**, 713-722. <http://dx.doi.org/10.1006/excr.1999.4716>
- [82] Vacik, J., Dean, B.S., Zimmer, W.E. and Dean, D.A. (1999) Cell-Specific Nuclear Import of Plasmid DNA. *Gene Therapy*, **6**, 1006-1014. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3300924>
- [83] Young, J.L., Benoit, J.N. and Dean, D.A. (2003) Effect of a DNA Nuclear Targeting Sequence on Gene Transfer and Expression of Plasmids in the Intact Vasculature. *Gene Therapy*, **10**, 1465-1470.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302021>
- [84] Young, J.L., Zimmer, W.E. and Dean, D.A. (2008) Smooth Muscle-Specific Gene Delivery in the Vasculature Based on Restriction of DNA Nuclear Import. *Experimental Biology and Medicine*, **233**, 840-848.
<http://dx.doi.org/10.3181/0712-RM-331>
- [85] Mesika, A., Grigoreva, I., Zohar, M. and Reich, Z. (2001) A Regulated, NFkappaB-Assisted Import of Plasmid DNA into Mammalian cell Nuclei. *Molecular Therapy*, **3**, 653-657. <http://dx.doi.org/10.1006/mthe.2001.0312>
- [86] Langle-Rouault, F., Patzel, V., Benavente, A., Taillez, M., Silvestre, N., Bompard, A., Sczakiel, G., Jacobs, E. and Rittner, K. (1998) Up to 100-Fold Increase of Apparent Gene Expression in the Presence of Epstein-Barr Virus *oriP* Sequences and EBNA1: Implications of the Nuclear Import of Plasmids. *Journal of Virology*, **72**, 6181-6185.
- [87] Vaysse, L., Harbottle, R., Bigger, B., Bergau, A., Tolmachov, O. and Coutelle, C. (2004) Development of a Self-Assembling Nuclear Targeting Vector System Based on the Tetracycline Repressor Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 5555-5564. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M311894200>
- [88] Pichon, C., Billiet, L. and Midoux, P. (2010) Chemical Vectors for Gene Delivery: Uptake and Intracellular Trafficking. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**, 640-645. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.07.003>
- [89] Thomas, C.E., Ehrhardt, A. and Kay, M.A. (2003) Progress and Problems with the Use of Viral Vectors for Gene Therapy. *Nature Reviews Genetics*, **4**, 346-358. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1066>
- [90] Naldini, L., Blömer, U., Gage, F.H., Trono, D. and Verma, I.M. (1996) Efficient Transfer, Integration, and Sustained Long-Term Expression of the Transgene in Adult Rat Brains Injected with a Lentiviral Vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 11382-11388.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.21.11382>
- [91] Verma, I.M. and Weitzman, M.D. (2005) Gene Therapy: Twenty-First Century Medicine. *Annual Review of Biochemistry*, **74**, 711-738. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.050304.091637>
- [92] Casimiro, D.R., Chen, L., Fu, T.M., Evans, R.K., Caulfield, M.J., Davies, M.E., Tang, A., Chen, M., Huang, L., Harris, V., Freed, D.C., Wilson, K.A., Dubey, S., Zhu, D.M., Nawrocki, D., Mach, H., Troutman, R., Isopi, L., Williams, D., Hurni, W., Xu, Z., Smith, J.G., Wang, S., Liu, X., Guan, L., Long, R., Trigona, W., Heidecker, G.J., Perry, H.C., Per-

- saud, N., Toner, T.J., Su, Q., Liang, X., Youil, R., Chastain, M., Bett, A.J., Volkin, D.B., Emini, E.A. and Shiver, J.W. (2003) Comparative Immunogenicity in Rhesus Monkeys of DNA Plasmid, Recombinant Vaccinia Virus, and Replication-Defective Adenovirus Vectors Expressing a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Gene. *Journal of Virology*, **77**, 6305-6313. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.11.6305-6313.2003>
- [93] Catanzaro, A.T., Koup, R.A., Roederer, M., Bailer, R.T., Enama, M.E., Moodie, Z., Gu, L., Martin, J.E., Novik, L., Chakrabarti, B.K., Butman, B.T., Gall, J.G., King, C.R., Andrews, C.A., Sheets, R., Gomez, P.L., Mascola, J.R., Nabel, G.J. and Graham, B.S. (2006) Phase 1 Safety and Immunogenicity Evaluation of a Multiclade HIV-1 Candidate Vaccine Delivered by a Replication-Defective Recombinant Adenovirus Vector. *The Journal of Infectious Diseases*, **194**, 1638-1649. <http://dx.doi.org/10.1086/509258>
- [94] Lee, H.J., Park, N., Cho, H.J., Yoon, J.K., Van, N.D., Oh, Y.K. and Kim, Y.B. (2009) Development of a Novel Viral DNA Vaccine against Human Papillomavirus: AcHERV-HP16L1. *Vaccine*, **28**, 1613-1619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.044>
- [95] Van DrunenLittel-van den Hurk, S., Gerdts, V., Loehr, B.I., Pontarollo, R., Rankin, R., Uwiera, R. and Babiuk, L.A. (2000) Recent Advances in the Use of DNA Vaccines for the Treatment of Diseases of Farmed Animals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **43**, 13-28. [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00574-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00574-1)
- [96] Babiuk, L.A., Pontarollo, R., Babiuk, S., Loehr, B. and Van Drunen Little-van den Hurk, S. (2003) Induction of Immune Responses by DNA Vaccines in Large Animals. *Vaccine*, **21**, 649-658.
- [97] Palumbo, R.N., Zhong, X., Panus, D., Han, W., Ji, W. and Wang, C. (2012) Transgene Expression and Local Tissue Distribution of Naked and Polymer-Condensed Plasmid DNA after Intradermal Administration in Mice. *Journal of Controlled Release*, **159**, 232-239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.012>
- [98] Lodmell, D.L., Ray, N.B. and Ewalt, L.C. (1998) Gene Gun Particle Mediated Vaccination with Plasmid DNA Confers Protective Immunity against Rabies Virus Infection. *Vaccine*, **16**, 115-118. [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)88325-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(97)88325-9)
- [99] Yoshida, A., Nagata, T., Uchijima, M., Higashi, T. and Koide, Y. (2000) Advantage of Gene Gun-Mediated over Intramuscular Inoculation of Plasmid DNA Vaccine in Reproducible Induction of Specific Immune Responses. *Vaccine*, **18**, 1725-1729. [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00432-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00432-6)
- [100] Fuller, D.H., Loudon, P. and Schmaljohn, C. (2006) Preclinical and Clinical Progress of Particle-Mediated DNA Vaccines for Infectious Diseases. *Methods*, **40**, 86-97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.022>
- [101] Tacket, C.O., Roy, M.J., Widera, G., Swain, W.F., Broome, S. and Edelman, R. (1999) Phase 1 Safety and Immune Response Studies of a DNA Vaccine Encoding Hepatitis B Surface Antigen Delivered by a Gene Delivery Device. *Vaccine*, **17**, 2826-2829. [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00094-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00094-8)
- [102] Dileo, J., Miller, J.R., Chesnoy, S. and Huang, L. (2003) Gene Transfer to Subdermal Tissues via a New Gene Gun Design. *Human Gene Therapy*, **14**, 79-87. <http://dx.doi.org/10.1089/10430340360464732>
- [103] Trimble, C., Lin, C.T., Hung, C.F., Pai, S., Juang, J., He, L., Gillison, M., Pardoll, D., Wu, L. and Wu, T.C. (2003) Comparison of the CD8+ T Cell Responses and Antitumor Effects Generated by DNA Vaccine Administered through Gene Gun, Biojector, and Syringe. *Vaccine*, **21**, 4036-4042.
- [104] Parham, J., Iannone, M., Overton, L. and Hutchins, J. (1998) Optimization of Transient Gene Expression in Mammalian Cells and Potential for Scale-Up Using Flow Electroporation. *Cytotechnology*, **28**, 147-155. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008046101653>
- [105] Kima, J., Choa, K., Shin, Y., Jung, N., Chunga, C. and Changa, J. (2007) A Multi-Channel Electroporation Microchip for Gene Transfection in Mammalian Cells. *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 3273-3277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2007.02.009>
- [106] Canatella, P.J., Karr, J.F., Petros, J.A. and Prausnitz, M.R. (2001) Quantitative Study of Electroporation Mediated Molecular Uptake and Cell Viability. *Biophysical Journal*, **80**, 755-764. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76055-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76055-9)
- [107] Gursel, I., Gursel, M., Ishii, K.J. and Klinman, D.M. (2001) Sterically Stabilized Cationic Liposomes Improve the Uptake and Immunostimulatory Activity of CpG Oligonucleotides. *The Journal of Immunology*, **167**, 3324e8.
- [108] Godbey, W.T., Wu, K.K. and Mikos, A.G. (1999) Tracking the Intracellular Path of Poly(Ethylenimine)/DNA Complexes for Gene Delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 5177-5181. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.9.5177>
- [109] Vuorimaa, E., Urtti, A., Seppanen, R., Lemmetyinen, H. and Yliperttula, M. (2008) Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy Reveals Functional Differences of Cationic Polymer DNA Complexes. *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 11695-11700. <http://dx.doi.org/10.1021/ja801503h>
- [110] Kircheis, R., Wightman, L. and Wagner, E. (2001) Design and Gene Delivery Activity of Modified Polyethylenimines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **53**, 341-358. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00202-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00202-2)

- [111] Ai, H., Jones, S.A., de Villiers, M.M. and Lvov, Y.M. (2003) Nano-Encapsulation of Furosemide Microcrystals for Controlled Drug Release. *Journal of Controlled Release*, **86**, 59-68. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00322-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00322-X)
- [112] Garzon, M.R., Berraondo, P., Crettaz, J., Ochoa, L., Vera, M., Lasarte, J.J., Vales, A., Van Rooijen, N., Ruiz, J., Prieto, J., Zulueta, J. and González-Aseguinolaza, G. (2005) Induction of gp120-Specific Protective Immune Responses by Genetic Vaccination with Linear Polyethylenimine-Plasmid Complex. *Vaccine*, **23**, 1384-1392. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.09.009>
- [113] Kasturi, S.P., Sachaphibulkij, K. and Roy, K. (2005) Covalent Conjugation of Polyethyleneimine on Biodegradable Microparticles for Delivery of Plasmid DNA Vaccines. *Biomaterials*, **26**, 6375-6385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.043>
- [114] Orson, F.M., Kinsey, B.M., Densmore, C.L., Nguyen, T., Wu, Y., Mbawuike, I.N. and Wyde, P.R. (2006) Protection against Influenza Infection by Cytokine-Enhanced Aerosol Genetic Immunization. *The Journal of Gene Medicine*, **8**, 488-497. <http://dx.doi.org/10.1002/jgm.864>
- [115] de Azevedo, M., Karczewski, J., Lefèvre, F., Azevedo, V., Miyoshi, A., Wells, J.M., Langella, P. and Chatel, J.M. (2012) *In Vitro* and *in Vivo* Characterization of DNA Delivery Using Recombinant *Lactococcus lactis* Expressing a Mutated Form of *L. monocytogenes* Internalin A. *BMC Microbiology*, **12**, 299. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-299>
- [116] Schaffner, W. (1980) Direct Transfer of Cloned Genes from Bacteria to Mammalian Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **77**, 2163-2167. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.77.4.2163>
- [117] Grillot-Courvalin, C., Goussard, S. and Courvalin, P. (1999) Bacteria as Gene Delivery Vectors for Mammalian Cells. *Current Opinion in Biotechnology*, **10**, 477-481. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00013-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00013-0)
- [118] Schoen, C., Stritzker, J., Goebel, W. and Pilgrim, S. (2004) Bacteria as DNA Vaccine Carriers for Genetic Immunization. *International Journal of Medical Microbiology*, **294**, 319-335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.03.001>
- [119] Hoebe, K., Janssen, E. and Beutler, B. (2004) The Interface between Innate and Adaptive Immunity. *Nature Immunology*, **5**, 971-974. <http://dx.doi.org/10.1038/ni1004-971>
- [120] Pilgrim, S., Stritzker, J., Schoen, C., Kolb-Mäurer, A., Geginat, G., Loessner, M.J., Gentschev, I. and Goebel, W. (2003) Bactofection of Mammalian Cells by *Listeria monocytogenes*: Improvement and Mechanism of DNA Delivery. *Gene Therapy*, **10**, 2036-2045. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302105>
- [121] Fennelly, G.J., Khan, S.A., Abadi, M.A., Wild, T.F. and Bloom, B.R. (1999) Mucosal DNA Vaccine Immunization against Measles with a Highly Attenuated Shigella Flexneri Vector. *The Journal of Immunology*, **162**, 1603-1610.
- [122] Shata, M.T. and Hone, D.M. (2001) Vaccination with a Shigella DNA Vaccine Vector Induces Antigen-Specific CD8⁺ T Cells and Antiviral Protective Immunity. *Journal of Virology*, **75**, 9665-9670. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.20.9665-9670.2001>
- [123] Woo, P.C.Y., Wong, L., Zheng, B. and Yuen, K. (2001) Unique Immunogenicity of Hepatitis B Virus DNA Vaccine Presented by Live-Attenuated *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*, **19**, 2945-2954. [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00530-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00530-2)
- [124] Zheng, B., Woo, P.C.Y., Ng, M., Tsoi, H., Wong, L. and Yuen, K. (2001) A Crucial Role of Macrophages in the Immune Responses to oral DNA Vaccination against Hepatitis B Virus in a Murine Model. *Vaccine*, **20**, 140-147. [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00272-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00272-9)
- [125] Miki, K., Nagata, T., Tanaka, T., Kim, Y.H., Uchijima, M., Ohara, N., Nakamura, S., Okada, M. and Koide, Y. (2004) Induction of Protective Cellular Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by Recombinant Attenuated Self-Destructing *Listeria monocytogenes* Strains Harboring Eukaryotic Expression Plasmids for Antigen 85 Complex and MPB/MPT51. *Infection and Immunity*, **72**, 2014-2021. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.4.2014-2021.2004>
- [126] Dunham, S.P. (2002) The Application of Nucleic Acid Vaccines in Veterinary Medicine. *Research in Veterinary Science*, **73**, 9-16. [http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00032-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00032-2)
- [127] Pontes, D.S., de Azevedo, M.S.P., Chatel, J.M., Langella, P., Azevedo, V. and Miyoshi, A. (2011) *Lactococcus lactis* as a Live Vector: Heterologous Protein Production and DNA Delivery Systems. *Protein Expression and Purification*, **79**, 165-175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2011.06.005>
- [128] Wells, J.M. and Mercenier, A. (2008) Mucosal Delivery of Therapeutic and Prophylactic Molecules Using Lactic Acid Bacteria. *Nature*, **1038**, 1-14.
- [129] Guimarães, V.D., Innocentini, S., Lefèvre, F., Azevedo, V., Wal, J.M., Langella, P. and Chatel, J.M. (2006) Use of Native Lactococci as Vehicles for Delivery of DNA into Mammalian Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 7091-7097. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01325-06>
- [130] Gram, G. J., Fomsgaard, A., Thorn, M., Madsen, S.M. and Glenting, J. (2007) Immunological Analysis of a *Lactococcus lactis*-Based DNA Vaccine Expressing HIV gp120. *Genetic Vaccines and Therapy*, **5**, 3.
- [131] Tao, L., Pavlova, S.I., Ji, X., Jin, L. and Spear, G. (2011) A Novel Plasmid for Delivering Genes into Mammalian Cells

- with Noninvasive Food and Commensal Lactic Acid Bacteria. *Plasmid*, **65**, 8-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.09.001>
- [132] Pontes, D., Innocentin, S., Del Carmen, S., Almeida, J.F., Leblanc, J.G., de Moreno de Leblanc, A., Blugeon, S., Cherbuy, C., Lefèvre, F., Azevedo, V., Miyoshi, A., Langella, P. and Chatel, J.M. (2012) Production of Fibronectin Binding Protein A at the Surface of *Lactococcus lactis* Increases Plasmid Transfer *in Vitro* and *in Vivo*. *PLoS ONE*, **7**, e44892. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044892>
- [133] Gaillard, J.L., Berchem P., Frehel, C., Gouln, E. and Cossart, P. (1991) Entry of *Listeria monocytogenes* into Cells Is Mediated by Internalin, a Repeat Protein Reminiscent of Surface Antigens from GRAM-Positive Cocci. *Cell*, **65**, 1127-1141. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90009-N](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(91)90009-N)
- [134] Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mège, R.M. and Cossart, P. (1996) E-Cadherin Is the Receptor for Internalin, a Surface Protein Required for Entry of *L. monocytogenes* into Epithelial Cells. *Cell*, **84**, 923-932. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81070-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81070-3)
- [135] Guimarães, V.D., Gabriel, J.E., Lefèvre, F., Cabanes, D., Gruss, A., Cossart, P., Azevedo, V. and Langella, P. (2005) Internalin-Expressing *Lactococcus lactis* Is Able to Invade Small Intestine of Guinea Pigs and Deliver DNA into Mammalian Epithelial Cells. *Microbes and Infection*, **7**, 836-844. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2005.02.012>
- [136] Innocentin, S., Guimarães, V., Miyoshi, A., Azevedo, V., Langella, P., Chatel, J.M. and Lefèvre, F. (2009) *Lactococcus lactis* Expressing Either *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Protein A or *Listeria monocytogenes* Internalin A Can Efficiently Internalize and Deliver DNA in Human Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 4870-4878. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00825-09>
- [137] Que, Y.A., Francois, P., Haefliger, J.A., Entenza, J.M., Vaudaux, P. and Moreillon, P. (2001) Reassessing the Role of *Staphylococcus aureus* Clumping Factor and Fibronectin-Binding Protein by Expression in *Lactococcus lactis*. *Infection and Immunity*, **69**, 6296-6302. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.10.6296-6302.2001>
- [138] Davis, B.S., Chang, G.J., Cropp, B., Roehrig, J.T., Martin, D.A., Mitchell, C.J., Bowen, R. and Bunning, M.L. (2001) West Nile Virus Recombinant DNA Vaccine Protects Mouse and Horse from Virus Challenge and Expresses *in Vitro* a Noninfectious Recombinant Antigen That Can Be Used in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Journal of Virology*, **75**, 4040-4047. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.9.4040-4047.2001>
- [139] Davidson, A.H., Traub-Dargatz, J.L., Rodeheaver, R.M., Ostlund, E.N., Pedersen, D.D., Moorhead, R.G., Stricklin, J.B., Dewell, R.D., Roach, S.D., Long, R.E., Albers, S.J., Callan, R.J. and Salman, M.D. (2005) Immunologic Responses to West Nile Virus in Vaccinated and Clinically Affected Horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **226**, 240-245. <http://dx.doi.org/10.2460/javma.2005.226.240>
- [140] Bergman, P.J., McKnight, J., Novosad, A., Charney, S., Farrelly, J., Craft, D., Wulderk, M., Jeffers, Y., Sadelain, M., Hohenhaus, A.E., Segal, N., Gregor, P., Engelhorn, M., Riviere, I., Houghton, A.N. and Wolchok, J.D. (2003) Long-Term Survival of Dogs with Advanced Malignant Melanoma after DNA Vaccination with Xenogeneic Human Tyrosinase: A Phase I Trial. *Clinical Cancer Research*, **9**, 1284-1290.
- [141] Liao, J.C., Gregor, P., Wolchok, J.D., Orlandi, F., Craft, D., Leung, C., Houghton, A.N. and Bergman, P.J. (2006) Vaccination with Human Tyrosinase DNA Induces Antibody Responses in Dogs with Advanced Melanoma. *Cancer Immunity*, **6**, 8.
- [142] Kalams, S.A., Parker, S., Jin, X., Elizaga, M., Metch, B., Wang, M., Hural, J., Lubeck, M., Eldridge, J., Cardinali, M., Blattner, W.A., Sobieszczyk, M., Suriyanon, V., Kalichman, A., Weiner, D.B. and Baden, L.R. (2012) Safety and Immunogenicity of an HIV-1 Gag DNA Vaccine with or without IL-12 and/or IL-15 Plasmid Cytokine Adjuvant in Healthy, HIV-1 Uninfected Adults. *PLoS ONE*, **7**, e29231. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029231>
- [143] Pereira, V.B., Zurita-Turk, M., Saraiva, T.D.L., Prósperi, C.D.C., Souza, B.M., Mancha-Agreti, P., Lima, F.A., Pfeiffer, V.N., Azevedo, M.S.P., Rocha, C.S., Pontes, D.S., Azevedo, V. and Miyoshi, A. (2013) DNA Vaccines Approach: From Concepts to Applications. Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education. Microbial Book Series, 2013 Edition.
- [144] Kutzler, M. and Weiner, D.B. (2008) DNA Vaccines: Ready for Prime Time? *Nature*, **9**, 776-788.

VIII.3 Anexo III

Artigo científico apresentando os resultados obtidos

A novel ESAT-6 DNA mucosal delivery system is able to generate an immune response to tuberculosis in mice

Vanessa Bastos Pereira^a; Tessália Diniz Luerce Saraiva^a; Marcela Santiago Pacheco Azevedo^a; Meritxell Zurita Turk^a; Bianca Mendes Souza^a; Camila Prósperi De Castro^a; Pamela Mancha Agresti^a; Janete Soares Coelho dos Santos^b; Ana Cristina Gomes Santos^c; Sophie Leclercq^b; Vasco Azevedo^a; Anderson Miyoshi^{a*}

^aLaboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte-MG, Brazil.

^bLaboratório de Inovação Biotecnológica, Fundação Ezequiel Dias, Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

^cLaboratório de Imunobiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

* Corresponding author: Anderson Miyoshi; Address: Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brasil. CEP: 31270-901; E-mail address: miyoshi@icb.ufmg.br; phone number: +55 31 34 09 27 78

Abstract

The use of the food-grade bacterium *Lactococcus lactis* as vehicle for the delivery of DNA vaccine plasmids by oral route constitutes a promising strategy for vaccination against various infectious diseases. As the delivery of DNA plasmids to eukaryotic cells is of critical importance for subsequent DNA expression and effectiveness of the vaccine, it is believed that the use of the recombinant invasive *L. lactis* FnBPA+ strain for oral delivery of the eukaryotic expression vector pValac for expression of the ESAT-

6 antigen (6-kDa Early Secreted Antigenic Target) of *Mycobacterium tuberculosis* by host cells could represent a new DNA vaccine strategy against Tuberculosis. Thus, the goal of this work was to construct the *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) and test this strain in BALB/c mice. For this purpose, the coding sequence of ESAT-6 was firstly cloned into the pValac vector and its functionality was confirmed by immunocytochemistry. Following, the *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) strain was constructed and its immunological profile was checked in BALB/c mice. This oral strain was able to significantly increase INF- γ production in spleen cells, showing a systemic cell Th1 response, required for vaccines against tuberculosis. In addition, an increase of T CD4+ and T CD8+ IFN- γ producing cells in animals from the *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) group was also observed when compared to the negative group. Furthermore, these mice also showed a significant increase of specific secretory IgA production in colon tissue and fecal extract. Thus, this is the first time that *L. lactis* was used to deliver a plasmid DNA harboring an antigen against tuberculosis through mucous membranes.

Keywords: *Lactococcus lactis*, DNA delivery system, Tuberculosis, ESAT-6

1. Introduction

Mucosal administration of bacterial carriers to deliver plasmid DNA constitutes a promising vaccination strategy. However, most of the bacteria used to deliver DNA vaccines into mammalian cells are invasive pathogens such as *Listeria*, *Salmonella*, and *Shigella* (Schoen *et al.*, 2004). Nevertheless, the risk associated with possible reversion to their virulent phenotype is a major concern (Dunham, 2002). Therefore, due to safety reasons, food and commensal lactic acid bacteria (LAB) have been used as an alternative of DNA delivery vehicles to develop DNA vaccines (Wells and Mercenier, 2008). *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), the LAB model, obtained the GRAS (Generally Recognized As Safe) status due to its lack of pathogenicity and has been

extensively used for the production and delivery of antigens and cytokines and, more recently, as well as vehicle for the delivery of DNA vaccines by oral route (Wells and Mercenier, 2008; Guimarães *et al.*, 2009).

Internalization of the bacterial carrier is a fundamental step to achieve efficient DNA delivery in eukaryotic cells (Grillot-Courvalin *et al.*, 1998). In order to increase this, an invasive *L. lactis* strain (*L. lactis* FnBPA+), that expresses the Fibronectin binding protein A (FnBPA) of *Staphylococcus aureus*, a bacterial invasin that is involved in intracellular spreading in the host (Que *et al.*, 2001; Innocentin *et al.*, 2009), was developed. Furthermore, a new plasmid called pValac was also constructed for eukaryotic DNA vaccination using LAB, and which contains the cytomegalovirus promoter (pCMV) and the polyadenylation sequence (polyA) from the bovine growth hormone (BGH). Its applicability was confirmed when the green fluorescent protein (GFP) was expressed in PK15 and Caco-2 cells transfected with the the pValac:*gfp* plasmid (Guimarães *et al.*, 2009).

The *L. lactis* FnBPA+ strain was then tested for its internalization ability and its potential as DNA vaccine delivery vehicle and showed to be invasive and capable of transferring the pValac:*gfp* plasmid to Caco-2 cells with an increased GFP expression when compared to native lactococci (Innocentin *et al.*, 2009). Furthermore, in mice, oral administration of the invasive *L. lactis* FnBPA+ (pValac:*gfp*) strain showed GFP expression in epithelial cells of the small and large intestines by fluorescent microscopy, confirming the capacity of invasive recombinant LAB as DNA delivery vectors *in vivo* (Pontes *et al.*, 2012; del Carmen *et al.*, 2013).

In this regard, it is believed that the use of invasive *L. lactis* strains containing the pValac vector, for eukaryotic expression of specific antigens, could represent a new strategy for controlling infectious diseases, such as Tuberculosis (TB). TB is still the leading killer worldwide among young adults caused by a single infectious agent and which results in more than 8 million new TB cases and 2 million deaths annually. Moreover, about one third of the global human population is estimated to be affected

by latent TB (Pieters, 2008). *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette Guerin (BCG), the only available TB vaccine for over the last 80 years, is ineffective against pulmonary TB in adults (Liu *et al.*, 2009). Hence, the development of effective vaccination strategies against TB represents one of the prime objectives of TB research.

Comparative genomic analyses identified locus regions called regions of difference (RD) that were deleted from the BCG genome during its divergence from *M. bovis*, event perhaps contributed to the inadequate protection imparted by BCG (Mostowy *et al.*, 2003). ESAT-6 (6-kDa Early Secreted Antigenic Target), an immunodominant secretory protein of *Mycobacterium tuberculosis* encoded by the RD1 locus is present in all pathogenic members of the *M. tuberculosis* complex (Pym *et al.*, 2002). ESAT-6, which has a large number of B and T cell epitopes, is strongly recognized during the early phase of *M. tuberculosis* infection, as well as in patients with active TB, and is a potent inducer of long-lasting memory immunity against TB (Andersen *et al.*, 1993; Brandt *et al.*, 1996). The strong immunogenicity of ESAT-6 and its absence in the BCG vaccine makes this antigen an attractive target for the development of a new TB vaccine.

Thus, this study aimed to construct the pValac:ESAT-6 plasmid, verify its functionality *in vitro*, construct the invasive *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) strain to orally immunize BALB/c mice and evaluate the out coming immunological cellular and humoral response. This work may represent a first step towards the development of a new methodology for oral DNA vaccines delivered by recombinant *L. lactis*.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions: The bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *L. lactis* subsp. *cremoris* strains were grown in M17 (Difco, Sparks, MD, USA) medium supplemented with 0.5% glucose (GM17) at 30°C without agitation. *Escherichia coli* (*E. coli*) strains were aerobically grown in Luria-

Bertani (LB) medium at 37°C with vigorous shaking. Bacteria were selected by the addition of antibiotics as necessary: for *L. lactis*, erythromycin (Ery) 5 µg/mL and/or chloramphenicol (Cm) 10 µg/mL; for *E. coli*, Cm 10 µg/mL and/or kanamycin (Km) 50 µg/mL.

2.2. DNA manipulations: General DNA manipulations techniques were carried out according to standard procedures. Unless otherwise indicated, DNA restriction and modification enzymes were used as recommended by the suppliers. Plasmid DNA from *E. coli* and *L. lactis* were isolated as previously described (Sambrook *et al.*, 1989) with the following modifications: for plasmid DNA extraction from *L. lactis*, the first step included addition of TES (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 300 mM NaCl) containing lysozyme (10 mg/mL) for 60 min at 37°C to prepare protoplasts. Electroporation of *L. lactis* was performed as previously described (Langella *et al.*, 1993): *L. lactis* transformants were plated onto GM17 agar plates containing the required antibiotic and were counted after 1 day incubation at 30°C.

2.3. pValac:ESAT-6 and *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) construction: The ORF of ESAT-6 was amplified from the genomic DNA of the *M. tuberculosis* H37Rv strain using the Pfx Platinum[®] DNA polymerase (Invitrogen) and the specific oligonucleotides for ESAT-6: 5'- GGATCCACCATGGAGCAGCAGTGG AATTTTCGCG-3' (ESAT-6 Fwd) and 5'-GAATTCCTATGCGAACATCCCAGTGACG-3' (ESAT-6 Rev). The amplified product was purified (Kit illustra[™] GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification – GE Healthcare) and cloned into the Zero Blunt[®] TOPO[®] vector (Invitrogen) and transformed in *E. coli* TOP10. Following, the 300 bp ORF of ESAT-6 and the pValac vector were both digested with *Bam*HI and *Eco*RI restriction enzymes, gel purified and ligated using the T4 DNA ligase (Promega), and transformed in *E. coli* TG1 to obtain the *E. coli* TG1 (pValac:ESAT-6) strain. The integrity of the insert was confirmed by

sequencing using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in an ABI3130 sequencing equipment (Applied Biosystems).

Following, the pValac:ESAT-6 plasmid was transformed into the *L. lactis* FnBPA+ strain. To confirm the *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) construction, specific primers for the pValac vector (ValF- 5' GCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG-3' and ValR 5'-GGCTGATCAGCGGGTTTAAACG-3') and for part of the ORF of fibronectin (FnAF- 5'-TCAGCTATTGATATCGATTA-3' and FnAR- 5' CAACACTATTGTGTCCACCG 3') were used.

2.4. Transfection assays of mammalian CHO cells with the pValac:ESAT-6: The pValac:ESAT-6 plasmid was assayed for ESAT-6 expression by transfection into the Chinese hamster ovary cell line [Flp-InTM-CHO (Invitrogen)]. CHO cells were cultured in complete Nutrient Mixture F12 Ham medium (Sigma), supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), 1% L-glutamine (Sigma), 100 ng/mL zeocin and 2,5% HEPES (Sigma). Ninety to 95% confluent CHO cells were then transfected with 4 µg of pValac:ESAT-6, or pValac:gfp (positive control), or none plasmid (negative control), previously complexed with Lipofectamine2000 (Invitrogen) as described by the supplier. The transfection efficiency of GFP-producing cells (positive control) was visualized 48 to 72 hours after transfection with a fluorescent microscope (Zeiss Axiovert 200).

2.5. Analysis of the ESAT-6 protein by immunofluorescence: Cells transfected or not with the pValac:ESAT-6 plasmid were washed twice in Phosphate Buffered Saline (PBS) solution, fixed for 15 min with paraformaldehyde (4% in PBS) and permeabilized with Triton X-100 (0.1% in PBS) for 10 min at room temperature. The cells were then incubated in a 1/50 dilution of specific rabbit polyclonal IgG anti-ESAT-6 antibody (Abcam) (10 µg/mL) in PBS/BSA 1% for 120 min at room temperature and rinsed three times in PBS. Following, the cells were then incubated in a 1/500 dilution of anti-rabbit

IgG Alexa-Fluor 488 (Invitrogen) (4 µg/mL) in PBS/BSA 1% and DAPI (Invitrogen) (2 µg/mL) for 60 min at room temperature in the dark. Samples were mounted with hydramount and the images were captured using a Zeiss LSM 510 META inverted confocal laser-scanning microscope equipped with an argon laser and blue filter with maximum emission of 520 nm; a filter with emission around 461 nm was used for DAPI detection. Images of each sample were collected and analyzed using the Zeiss LSM Image Browser software.

Cells transfected or not with the pValac:ESAT-6 plasmid were examined through flow cytometry. Using the Foxp3 Staining Buffer Set Kit (eBioscience), 10^6 cells were incubated with fixation buffer, washed and incubated with the permeabilization buffer. Thereafter, the pellet was incubated with the rabbit polyclonal IgG anti-ESAT-6 antibody (Abcam) (10 µg/mL) diluted in PBS/BSA 1% for 30 min at room temperature and then washed. Following, the cells were incubated in a 1/500 dilution of anti-rabbit IgG Alexa-Fluor 488 (Invitrogen) (4 µg/mL) for 30 min at room temperature in the dark. After washing twice, the cells were fixed with paraformaldehyde and quantification of ESAT-6 producing CHO cells was performed using a FACScan (Becton Dickinson Bioscience) equipment and data acquired were analyzed using the FlowJo program (TreeStar, Ashland, OR, USA).

2.6. Cloning, expression and purification of the recombinant ESAT-6 protein: The ORF of ESAT-6 was amplified from the genomic DNA of the *M. tuberculosis* H37Rv strain using specific oligonucleotides (FprotESAT-6: 5' CACCATGACAGAGCAGCAGTGG AATTC 3' and RprotESAT-6: 5' AAATGCGAACATCCCAGTGACGTT 3') designed for directional cloning in the expression vector pBAD202/D-TOPO® (Invitrogen) and transformed in *E. coli* TOP10, according to manufacturer's instructions. The nucleotide sequence of the cloned insert was confirmed by sequencing. To induce the ESAT-6 expression from *E. coli* pBAD:ESAT-6, arabinose was used as inducer at a final concentration of 0.002%; the

induced culture was lysed in a solution of 2M urea and purified using nickel columns (*HisTrap™ HP Columns - Easy, High-performance Purification* - GE Healthcare) and FPLC ÄKTAPRIME *plus* (GE Healthcare). To visualize the molecular weight of the recombinant ESAT-6 protein (rESAT-6) and confirm its purity, it was resolved by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue solution and the Silver Nitrate method (Sambrook *et al.*, 1989). The immunogenicity of the purified rESAT-6 was verified by ELISA using a commercial mouse monoclonal anti-ESAT-6 antibody (Abcam).

2.7. Mice: Conventional BALB/c mice, with 4-5 weeks of age, obtained from the inbred closed colony (CEBIO) maintained at the Federal University of Minas Gerais (UFMG - Belo Horizonte, Brazil), were treated with Ivermectina 0.001% (Agener União) and used for the immunization assays. Procedures and manipulation of animals followed the rules of the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA/UFMG/Brasil). All animals were maintained in collective cages (5 animals/cage) in an environmentally controlled room with a 12-hour light/dark cycle and unlimited free access to water and food and each animal was analyzed individually.

2.8. Immunization assay with *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6): BALB/c mice were divided in the following experimental groups: saline (negative); *L. lactis* MG1363 (wild type *L. lactis* strain; control); *L. lactis* FnBPA+ (invasive *L. lactis* strain; control); *L. lactis* MG1363 (pValac:ESAT-6) and *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6). Mice were orally immunized by gavage with 1×10^8 CFU of bacterial suspension in a final volume of 100 μ L of saline. Immunizations were ministered at three different times (days 1, 15 and 29) and at each time, mice were immunized for three consecutive days. Animals were sacrificed on day 42 after being anesthetized with a ketamine and xylazine mixture.

2.9. Characterization of the humoral immune response profile: Blood collection was performed during the experiment on days 14, 28 and on the day of scarification (day 42) and the serum was separated to evaluate anti-ESAT-6 immunoglobulins (IgG, IgG1, IgG2a and IgA). Mucosal secretory IgA (sIgA) was also measured from colon tissues and fecal extracts. These Igs were measured by Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Sambrook *et al.*, 1989), coating the plates with 5 µg/mL of rESAT-6.

2.10. Characterization of the cellular immune response profile: On the day of sacrifice, spleens were removed, macerated, and 1×10^6 cells/spleen were plated in complete RPMI 1640 (Sigma Aldrich) medium supplemented with 10% of fetal bovine serum, sodium pyruvate 1 mM, non-essential amino acids 1 mM, gentamicin 25 µg/mL and L-glutamine 2 mM, and maintained at 37°C and 5% CO₂. The spleen of each animal was seeded to 96-wells microtiter plates and treated by three different methods: experimental samples were stimulated with 5 µg/mL of rESAT-6, positive control samples were stimulated with 16µg/ml concanavalin A (ConA, Sigma) and only complete RPMI medium was added to negative control samples (non-stimulated cells). After 60h of stimuli, the supernatant of cells was collected to measure the cytokines INF-γ, TNF-α, IL-12, IL-10 and IL-4 through Sandwich ELISA (Sambrook *et al.*, 1989). The results were expressed by the subtraction of non-stimulated culture from the stimulated rESAT-6 culture.

2.11. Verification of INF-γ producing T CD4+ and T CD8+ cells by flow cytometry: The labeling of intracellular IFN-γ in T CD4+ and T CD8+ cells was performed using the culture of stimulated or not stimulated splenocytes with rESAT-6. For this, 1×10^6 cells were first plated and after 12 hours of incubation at 37°C and 5% CO₂, these were maintained in RPMI medium and Brefeldin A 10 µg/mL (Sigma) for 2h. Following, the cells were washed twice with PBS-BSA 1% and specific surface marker antibodies

[anti-mouse CD8-FITC 2.5 µg/mL and anti-mouse CD4-CY 0,66 µg/mL - BD Pharmagen™] were added and cells were incubated at 4°C for 30 minutes in the dark. After two more washes and using the Mouse Foxp3 Buffer set (BD Pharmagen™), cells were resuspended in fixation buffer and kept at 4°C for 30 minutes. The cells were then washed with a permeabilization solution and incubated at 4°C for 30 minutes. After washed, the cells were incubated with PE anti-mouse IFN-γ [4 µg/mL - BD Pharmagen™] at room temperature for 20 minutes in the dark. After washing twice, the cells were fixed with paraformaldehyde for analysis by flow cytometry using the FACScan equipment and analyzed using the FlowJo program (TreeStar, Ashland, OR, USA).

2.12. Statistical analysis: Statistical variance analysis was performed using the GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, CA, USA) and all results were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). Analyses were performed by One-way ANOVA followed by Bonferroni or Dunnett pos-test. A 95% confidence limit was considered to be significant ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Construction of *Lactococcus lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6): The ORF of ESAT-6 was successfully cloned into the pValac vector between the Cyto Megalo Virus promoter (pCMV) and the polyadenylation signal of Bovine Growth hormone (BGH polyA) sites, required for gene expression by host eukaryotic cells. The pValac vector also harbors a prokaryotic region containing the RepA/RepC replication origins for both *E. coli* and *L. lactis*, respectively, and a chloramphenicol resistance gene (Cm) for bacteria selection (Figure 1). The construction of the pValac:ESAT-6 plasmid was confirmed by digestion, PCR and sequencing (data not shown). The pValac:ESAT-6 plasmid was inserted into the invasive *L. lactis* FnBPA+ strain, a recombinant strain

that is capable of adhering and invading eukaryotic cells, resulting in the recombinant *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) strain.

3.2. Functionality of pValac:ESAT-6 plasmid in eukaryotic cells *in vitro*: In order to determine expression and protein production of ESAT-6 antigen by eukaryotic cells and subsequently functionality of pValac:ESAT-6, this plasmid is transfected in CHO cells. Through confocal microscopy and labeling the transfected cells with the specific antibodies, it was possible to visualize and verify the expression of the ESAT-6 protein by these cells after 72h of transfection with the pValac:ESAT-6 plasmid (Figure 2a, 2c and 2f). No fluorescence was visualized in the negative controls (Figure 2d and 2e). These results were also verified through flow cytometry (Figure 3). By representation of the results in dot plot graphics it was possible to confirm the expression of the ESAT-6 protein by CHO cells since approximately 34% of transfected cells emitted fluorescence (Figure 3a) against no fluorescence by non-transfected cells (Figure 3b), demonstrating that the pValac:ESAT-6 is functional.

3.3. The rESAT-6 protein was successfully purified: The ESAT-6 ORF was successfully cloned into the pBAD expression vector, and the construct was confirmed by PCR and sequencing. After induction of the culture with arabinose, it was possible to observe the production of the rESAT-6 protein, with the expected molecular weight (26kDa), in the insoluble cell fraction. Thus, the culture was lysed with 2M urea and the protein purified by fast protein liquid chromatography (FPLC), confirming the molecular weight and purity by the silver nitrate method. Moreover, it was confirmed by ELISA that the purified protein was reactive to commercial monoclonal anti-ESAT-6 antibody (data not shown).

3.4. *Lactococcus lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) was able to induce significant sIgA: The administration of *Lactococcus lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) to BALB/c

mice was able to increase anti-ESAT-6 sIgA in the colon tissues and fecal extracts. A statistically significant increase in specific sIgA production in colon tissues (Figure 4A) and in fecal extracts (Figure 4B) was observed when compared to all other groups tested. Regarding the humoral systemic response, levels of IgA, IgG and their isotypes IgG2a and IgG1 were measured in the serum of immunized mice, but no significant difference was observed during experiment (data no shown). Despite this, a slight non-significant increase was observed in serum IgA (Figure 4C). Two weeks after the last immunization there was a visual increase in the detection of serum IgA in the experimental *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) group, but this was not significantly different compared to the *L. lactis* FnBPA+ control group, where an increase of systemic IgA was not possible to confirm.

3.5. *Lactococcus lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) was able to induce significant

INF- γ production: The administration of *Lactococcus lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) to BALB/c mice was able to increase INF- γ production by spleen cells rESAT-6 stimulated. After 60h of stimulus, a significant increase in INF- γ production was observed in the group that received *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6), with the production approximately three times greater (1,5ng/mL) compared to all other control groups tested (Figure 5A). Regarding the other pro-inflammatory cytokines tested, IL-12 and TNF- α , no difference was observed between the experimental groups tested (Figure 5C and 5D). Furthermore, no significant difference was observed for the Th2 cytokines IL-10 and IL-4, with no significant difference of IL-10 between the groups tested and no significant detection of IL-4 (data not show). However, there was a significant increase, compared to the negative group, of intracellular IFN- γ producing T cells in mice immunized with the invasive *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) strain, as observed by flow cytometry. Approximately 13% of T CD8+ cells of mice from the *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) group were producing IFN- γ , versus approximately 8% in the negative group. However, only 1.7% of T CD4+ cells produced IFN- γ in mice

immunized with *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) when compared with the negative control that showed approximately 1% (Figure 6A and 6B).

4. Discussion: The use of LAB, and especially *L. lactis*, for the production of heterologous proteins of biotechnological interest is now a reality. With new information regarding these microorganisms and new genetic tools, new possibilities of use are being envisioned. In this context, the use of *L. lactis* as mucosal delivery system may represent a next step to be achieved in this area. For this, was developed the invasive *L. lactis* strain expressing FnBPA, able to enhance the deliver eukaryotic expression vectors to mucosal epithelial cells (Innocentin *et al.*, 2009). This system here presented uses oral administration, a non-invasive route that can be easily used in large immunization programs. Moreover, this immunization system can be used for the control of many infectious diseases whose pathogens invade the host through the mucosal surface, as is the case of TB.

In this regard, the use of *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) strain demonstrated that its oral administration in mice results in a specific immune response to ESAT-6, with significant mucous sIgA and INF- γ production, suggesting its ability for mucosal DNA delivery. Another result that confirmed our delivery system was the increase of INF- γ producing T CD4+ and T CD8+ cells. T CD8+ cells are the main cell type involved in the response to intracellular produced antigens, like in DNA plasmid delivery.

The immune response obtained using the immunodominant antigen ESAT-6 was as expected, since many authors have shown that this antigen has an important role in T cell response in the first stage of the infection and a large number epitopes have already been described (Lalvani *et al.*, 2001b; Mustafa *et al.*, 2000; Mustafa *et al.*, 2003). Moreover, several studies have also demonstrated the ability of this antigen, used as a DNA vaccine, to generate a predominantly Th1 response with high INF- γ production and consequent protection to TB challenge (Xu *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2012). In addition, it has already been shown that ESAT-6 acts by increasing the

immunogenicity and protection of the BCG vaccine when used in a prime-boosting vaccination regime (Wang *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2007).

Similar results were also obtained by Wang *et al.* (2009) using ESAT-6 in a study where the route (orogastric - gavage) and delivery method (bacteria - attenuated *Salmonella typhimurium*) were similar to this work. The production of the fusion ESAT6-Ag85B protein by this DNA vaccine developed a strong Th1 immune response with high amount of T CD8+ INF- γ producing cells and an increased proliferation of specific T CD4+ and T CD8+ cells. In this work, also was observed a significant increase of specific IgA in the serum and tissues of the intestine, stomach and lung of animals, with higher levels when compared to those observed using BCG alone. Moreover, when combining the DNA vaccine together with BCG higher production of sIgA was observed, being the highest in the intestinal tissue.

Regarding delivery systems, it has been previously shown that *L. lactis* expressing FnBPA is able to internalize *in vitro* and *in vivo* at higher rates compared to wild-type *L. lactis* due to the presence of the superficial FnBPA (Innocentin *et al.*, 2009; Pontes *et al.*, 2012; Pontes *et al.* 2014). In this context, the production of specific sIgA in the colon tissues and fecal extracts was approximately three-times higher in the *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) group in comparison with the non-invasive *L. lactis* MG1363 (pValac:ESAT-6) group. The same difference was observed regarding the cellular immune response, where the INF- γ stimulus of the invasive strain [*L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6)] was approximately three-times higher in comparison with the non-invasive [*L. lactis* MG1363 (pValac:ESAT-6)], which may suggest that the invasive strain was able to deliver the pValac:ESAT-6 vector at a higher rate or more efficiently, resulting in a higher ESAT-6 production, and consequently induce a better mucosal immune response.

The mechanism of action of this DNA vaccine probably mimics the viral infection. *L. lactis* carrying a DNA plasmid is internalized by intestinal cells and the major histocompatibility complex I (MHC-I) antigen presentation pathway enables the immune

system to detect cells with peptides from the pValac:ESAT-6 plasmid, such as infected enterocytes and dendritic cells (DCs). DCs are able to engulf bacteria from the intestinal lumen and then express ESAT-6 via the MHC-I pathway. If not directly infected, DCs can acquire exogenous antigens from producing enterocytes and presents them to the MHC-II or even via the MHC-I pathway, in a mechanism called cross-presentation (Joffre *et al.*, 2012). In this context, with the activation by DCs, modulation/activation of a Th1 profile with specific T CD4+ cells producing INF- γ occurs and specific naive antigen T CD8+ cells become effector cytotoxic T lymphocytes (CTLs).

In summary, these results show that oral administration of *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) is a good alternative to generate a specific immune response to the tuberculosis ESAT-6 antigen, suggesting the applicability and effectiveness of this novel DNA delivery-based strategy. Thus, further studies should be realized in order to optimize this delivery system.

Acknowledgements:

This study was supported by the grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (Fapemig).

References:

Andersen P, Heron I. Specificity of a protective memory immune response Against Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 1993; 61(March (3)):844–51.

Brandt L, Oettinger T, Holm A, Andersen AB, Andersen P. Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 1996; 157(October (8)):3527–33.

Dunham SP. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. Res. Vet. Sci. 2002; 73:9–16.

Fan X, Gao Q, Fu R. DNA vaccine encoding ESAT-6 enhances the protective efficacy of BCG against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. Scand J Immunol. 2007; 66(5):523-8.

Grillot-Courvalin C, Goussard S, Huetz F, Ojcius DM, Courvalin P. Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. Nat. Biotechnol. 1998; 16:862–866.

Guimarães V, Innocentini S, Chatel JM, Lefevre Langella, Azevedo V, Miyoshi A. A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. Genetic Vaccines and Therapy 2009; 7:4:1-24.

Innocentini S, Guimarães V, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Chatel JM, Lefèvre F. *Lactococcus lactis* Expressing either *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Protein A or *Listeria monocytogenes* Internalin A Can Efficiently Internalize and Deliver DNA in Human Epithelial Cells. Appl. Environ. Microbiol. 2009; 75 (14): 4870-4878.

Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. Nat Rev Immunol. 2012 Jul 13;12(8):557-69. doi: 10.1038/nri3254.

Lalvani, A.; Pathan, A.A.; Durkan, H.; Wilkinson, K.A.; Whelan, A.; Deeks, J.J.; Reece, W.H.; Latif, M.; Pasvol, G.; Hill, A.V. (2001b) Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Lancet 357, 2017–2021.

Langella P, Le Loir Y, Ehrlich SD, Gruss A. Efficient plasmid mobilization by pIP501 in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *J Bacteriol.* 1993; 175:5806-5813.

Liu L, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines* 2009; 5:270-78.

Mostowy S, Tsolaki AG, Small PM, Behr MA. The in vitro evolution of BCG vaccines. *Vaccine* 2003; 21 (27–30):4270–4.

Mustafa, A.S.; Oftung, F.; Amoudy, H.A.; Madi, N.M.; Abal, A.T.; Shaban, F.; Rosenkrands, I.; Andersen, P. (2000) Multiple epitopes from the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen are recognized by antigen-specific human T cell lines. *Clin. Infect. Dis.* 30(Suppl 3), S201–S205.

Mustafa, A.S.; Shaban, F.A.; Al-Attayah, R.; Abal, A.T.; El-Shamy, A.M.; Andersen, P.; Oftung, F. (2003) Human Th1 cell lines recognize the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen and its peptides in association with frequently expressed HLA class II molecules. *Scand. J. Immunol.* 57, 125–134.

Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell & Microbe Review* 2008; 3:399-407.

Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 2002; 46: 709–717.

Pontes D, Innocentin S, Del Carmen S, Almeida JF, Leblanc JG, de Moreno de Leblanc A, Blugeon S, Cherbuy C, Lefèvre F, Azevedo V, Miyoshi A, Langella P, Chatel JM. Production of Fibronectin Binding Protein A at the surface of *Lactococcus lactis* increases plasmid transfer in vitro and in vivo. *PLoS One* 2012; 7(9):e44892.

Pontes D, Azevedo M, Innocentin S, Blugeon S, Lefèvre F, Azevedo V, Miyoshi A, Courtin P, Chapot-Chartier MP, Langella P, Chatel JM. Immune Response Elicited by DNA Vaccination Using *Lactococcus lactis* Is Modified by the Production of Surface Exposed Pathogenic Protein. *PLoS One*. 2014 Jan 21;9(1):e84509.

Que YA, Francois P, Haefliger JA, Entenza JM, Vaudaux P, Moreillon P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect. Immun.* 2001; 69:6296–6302.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Press; 1989.

Schoen C, Stritzker J, Goebel W, Pilgrim S. Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 294:319–335.

Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, Lew D, Krause KH, Peters G, Herrmann M. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect. Immun.* 2000; 68:6871–6878.

Wang QM, Sun SH, Hu ZL, Yin M, Xiao CJ, Zhang JC. Improved immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine encoding ESAT6 by DNA priming and protein boosting. *Vaccine* 2004; 22, 3622–3627.

Wang QL, Pan Q, Ma Y, Wang K, Sun P, Liu S, Zhang, XL. An attenuated *Salmonella*-vectored vaccine elicits protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* Vaccine 2009; 27, 6712–6722

Wells JM and Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 2008; 6:349–362.

Xu J, Xu W, Chen X, Zhao D, Wang Y. Recombinant DNA vaccine of the early secreted antigen ESAT-6 by *Mycobacterium tuberculosis* and Flt3 ligand enhanced the cell-mediated immunity in mice. Vaccine 2008; 26, 4519–4525

Yuan W, Dong N, Zhang L, Liu J, Lin S, Xiang Z, Qiao H, Tong W, Qin C. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine expressing a fusion protein of Ag85B-Esat6-HspX in mice. Vaccine 2012; 30, 2490–2497.

Figures:

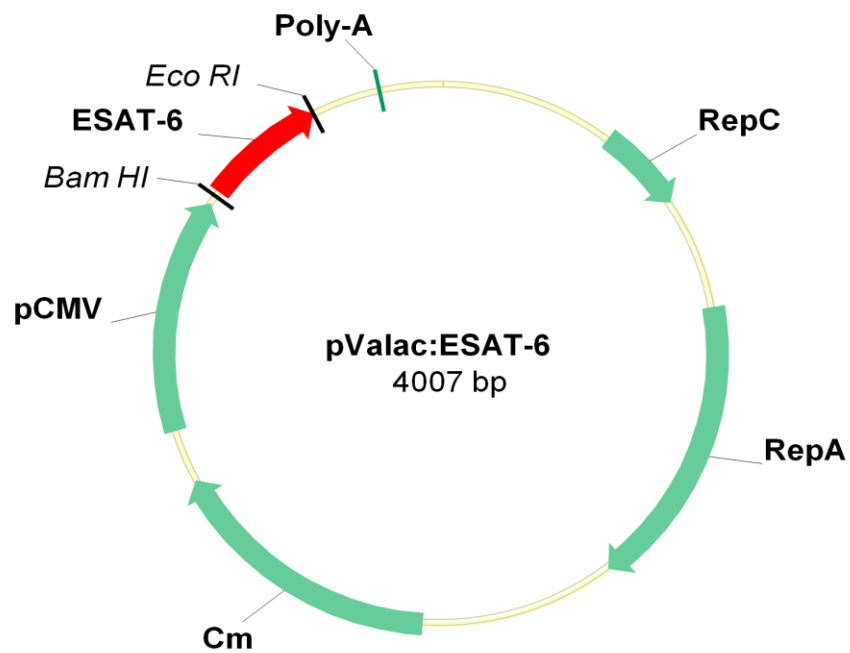


Fig. 1. Structure of the pValac:ESAT-6 plasmid. Risks indicate: BamHI and EcoRI restriction sites and BGH polyadenylation region (poly-A). Arrows indicate: cytomegalovirus promoter (pCMV); ORF of the 6-kDa Early Secreted Antigenic Target (ESAT-6); replication origin of *E. coli* (Rep A) and *L. lactis* (Rep C) and chloramphenicol resistance gene (Cm).

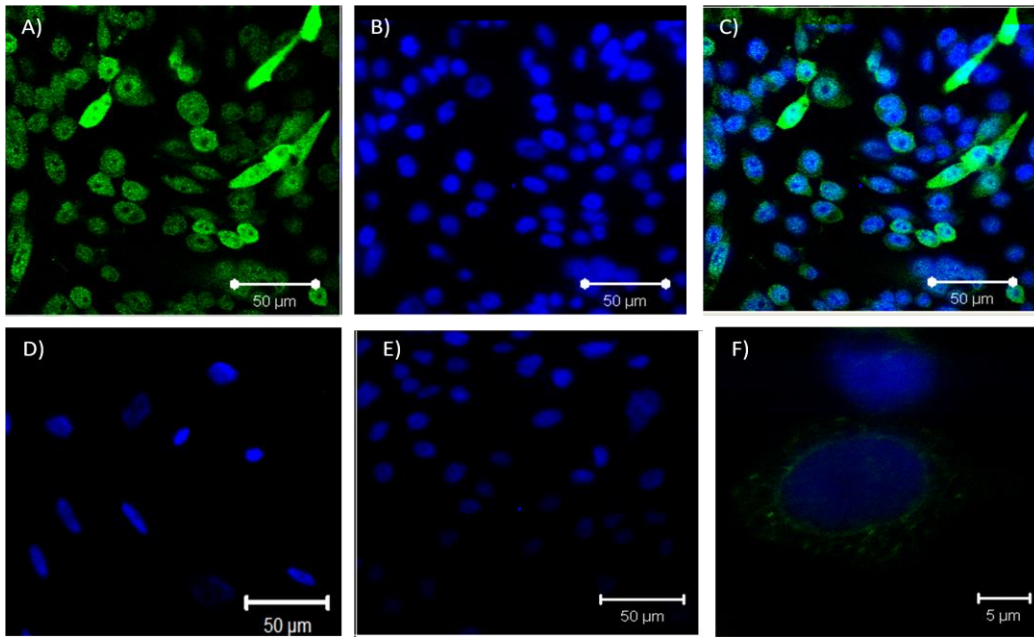


Fig. 2. Confocal microscopy: expression of the ESAT-6 protein by CHO cells transfected with the pValac:ESAT-6 plasmid. A) Capture of Alexa 488; B) Capture of DAPI; Overlap of images: C) Images A and B; D) Negative control of the primary and secondary antibodies; E) Negative control of the secondary antibody and F) Increased field of image C. Images obtained using a Zeiss LSM 510 META inverted confocal laser-scanning microscope with a 63X objective.

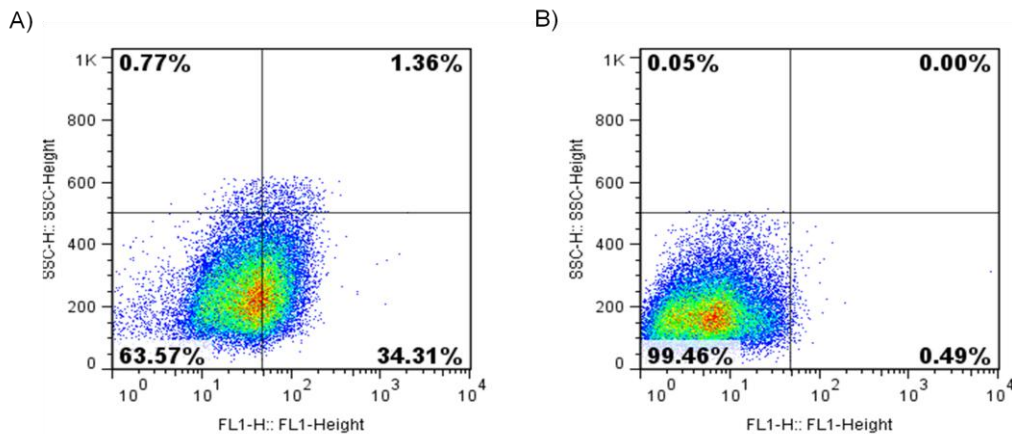


Fig. 3. Flow cytometry: expression of the ESAT-6 protein by CHO cells transfected with the pValac:ESAT-6 plasmid. A) Dot Plot showing the transfected cells labeled with specific antibodies for ESAT-6 labeling B) Dot Plot showing the non-

transfected cells labeled with specific primary anti-ESAT-6 and secondary Alexa 488 antibodies. Dot Plots showing the cell count on the Y axis and the FL1 detector (Argon laser, 488nm) on the X axis. Images obtained using the FlowJo software.

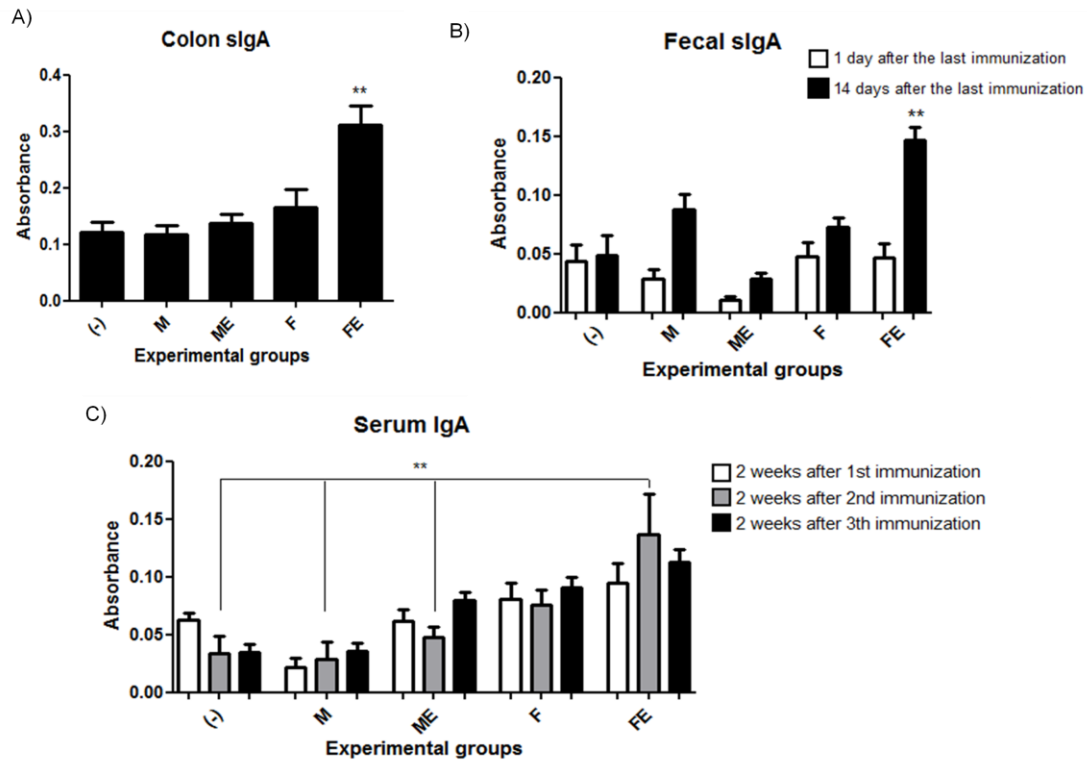


Fig. 4. Production of anti-ESAT-6 IgA in immunized animals. A) SIgA detection in colon tissues of immunized animals at the end of the experiment. B) SIgA detection in fecal extracts of immunized animals. Experimental groups: (-): Saline; M: *L. lactis* MG1363; ME: *L. lactis* MG1363 (pValac:ESAT-6) (non-invasive experimental group); F: *L. lactis* FnBPA+ (invasive control); FE: *L. lactis* FnBPA+ (pValac:ESAT-6) (invasive experimental group). Data is shown as the mean±SED and the data is from two independent experiments (n=10). P value: **p<0.01 versus all groups or as displayed on the figure, analyzed at the same immunization/collection time.

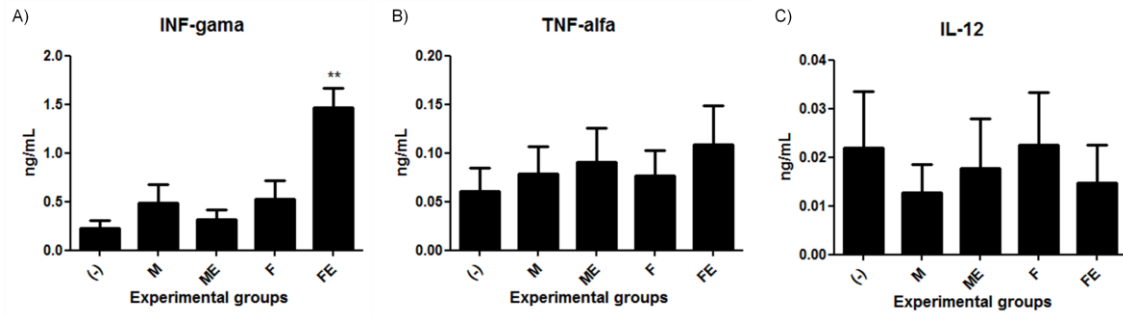


Fig. 5. Th1 type cytokines from the spleen cells in response to the recombinant ESAT-6 stimulus. Production levels analyzed by ELISA of A) INF- γ , B) TNF- α and C) IL-12 after 60h of cultured supernatants of spleen cells. The bar represents the stimulated culture minus the non-stimulated culture for each animal. Data is shown as the mean \pm SED and the data is from two independent experiments (n=10). P value: **p<0.01 versus all groups.

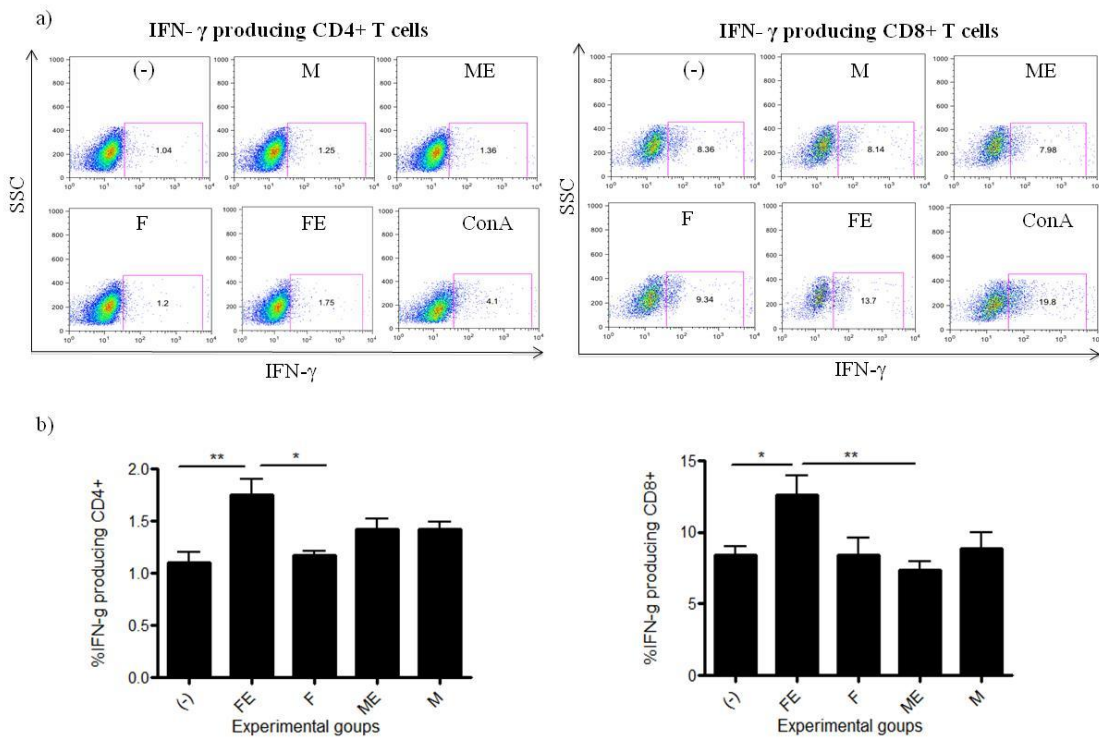


Fig. 6. INF- γ producing T CD4+ and T CD8+ cells analyzed by flow cytometry. A) Dot Plot showing INF- γ producing T CD4+ and T CD8+ cells, respectively. B) The percentages of INF- γ producing T CD4+ and T CD8+ cells represent the mean \pm SEM from a representative experiment of two independent experiments. *p < 0.05 and **p <

0.01. Results obtained from ESAT-6 stimulated splenocytes of immunized mice, labeled with anti CD8-FITC, anti CD4-CY and anti INF- γ -PE. Dot Plots showing the SSC (side scatter) on the Y axis and the FL2 detector (INF- γ -PE) on the X axis. Images obtained using the FlowJo software.

VIII.4 Anexo IV

Meios e Soluções

Meios e Soluções:

Acrilamida/Bisacrilamida 30% (SDS-PAGE): 29,2 g de acrilamida, 0,8 g de bisacrilamida e água milli-Q q.s.p. 100 mL.

AKTA Wash: Uréia 2 M, NaH_2PO_4 200 mM, NaCl 0,5 M e Imidazole 5 mM em H_2O destilada (ajustar pH 7,4). Autoclavar 121°C 15 minutos para armazenar.

AKTA Elution: Uréia 2 M, NaH_2PO_4 200 mM, NaCl 0,5 M e Imidazole 500 mM em H_2O destilada (ajustar pH 7,4). Autoclavar 121°C 15 minutos para armazenar.

Coating buffer (Tampão Carbonato) (ELISA): 1,86 g de Na_2CO_3 e 2,93 g de NaHCO_3 , completar o volume com água bidestilada para 1 L, ajustando-se o pH para 9,6. Estocar a 4°C.

DMEM: contendo 45 g/L de D-glicose, L-glutamina e 110 mg/L de piruvato de sódio, suplementado com 1% de Penicilina/Estreptamicina e 10% Soro Fetal Bovino (Gibco). Para cultura final, foi adicionado, ainda, 1% de HEPES (Life Technologies).

Gel de Poliacrilamida 15% (gel de separação): 5 mL de acrilamida/bisacrilamida 30%; 2,5 mL de Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 100 μL de SDS 10%; 2,3 mL de água milli-Q; 100 μL de PSA 10% e 4 μL de TEMED.

Gel de Poliacrilamida 5% (gel de concentração): 830 μL de acrilamida/bisacrilamida 30%, 630 μL de Tampão Tris-HCl 1 M pH 6,8, 50 μL de SDS 10%, 3,4 mL de água milli-Q, 50 μL de PSA 10% e 5 μL de TEMED.

Macs-Facs: Paraformaldeído 20x diluído em PBS 1x, filtrado 0,22 μm e pH 7,2

PBS 10X: 80 g de NaCl, 2 g de KCL, 11,45 g de Na_2HPO_4 e 2 g de KH_2PO_4 . Completar para 1 L com água destilada (pH 7,4). Autoclavar 121°C por 15 minutos.

PBS-caseína (Solução de Bloqueio) (ELISA): 1 L de PBS 1x, pH 7,2, e 2,5 g de caseína. Acrescentar a caseína ao PBS aquecido e filtrar em gaze, caso necessário. Estocar a -20°C.

PBS-Wash: PBS 1x + BSA 1%, pH 7,2

RPMI completo: 450 mL de RPMI 1640, contendo 2 mM de L-glutamina (LGC Biotecnologia), 50 mL de Soro fetal bovino (Gibco), 5 mL de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA - Gibco), 5 mL de solução de piruvato de sódio (Sigma), 0,450 mL de 2-mercaptoetanol (Life Technologies), 0,250 mL de Gentamicina (estoque a 50 mg/mL) e 0,9 mL de Estreptomicina (estoque a 25 mg/mL).

Salina-Tween (10X) (ELISA): 85 g de NaCl, 5 mL de Tween 20 e água bidestilada para 1 L (concentração de uso 1x).

Solução de Ácido sulfúrico (ELISA): 53,24 mL de H₂SO₄ em 1 L de água bidestilada.

Solução de Bradford: 25 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 12,5 mL de etanol, 25 mL de ácido orto-fosfórico, q.s.p 50 mL de água destilada. Solução armazenada ao abrigo de luz e a 4°C.

Solução de Coloração (Método de Nitrato de Prata): 10 mL de Nitrato de Prata, a 2,5%, 40 µL de formaldeído e água milli-Q q.s.p. 100 mL.

Solução de Comasie Blue (SDS-PAGE): 100 mL de ácido acético glacial, 500 mL de metanol, 0,5 g/L de brilhante blue R250 e 400 mL de água Mili-Q.

Solução descorante (SDS-PAGE): 40% de metanol, 10% de ácido acético em água destilada.

Solução de Finalização (Método de Nitrato de Prata): 1,46 g de EDTA-Na₂H₂O e água milli-Q q.s.p. 100 mL.

Solução de Fixação (Método de Nitrato de Prata): 40 mL de Etanol, 10 mL de Ácido acético e água milli-Q q.s.p. 100 mL.

Solução de Lise (Extração plasmideana de *L. lactis*): NaOH 0,2 N (200 µL); SDS 1% (250 µL); água destilada q.s.p. 5 mL.

Solução de Neutralização (Extração plasmideana de *L. lactis*): acetato de potássio 5 M (60 mL); ácido acético glacial (11,5 mL); água destilada q.s.p. 100 mL.

Solução Reveladora (Método de Nitrato de Prata): 2,5 g de Carbonato de Sódio, 20 µL de Formaldeído e água milli-Q q.s.p. 100 mL.

Solução de Revelação (ELISA): 4 mg de OPD, 10 mL de tampão citrato e 2 µL de H₂O₂. Preparar no momento do uso e proteger da luz.

Solução de Sensibilização (Método de Nitrato de Prata): 30 mL de etanol, 2 mL de tiosulfato de sódio a 10%, 6,8 g de acetato de sódio anidro, 0,5 mL de glutaraldeído, a 25%, e água milli-Q q.s.p. 100 mL.

Solução Tampão para extração de Tecidos: 23,4 g de NaCl, 500 µL de Tween 20, 5 g de BSA, 34 mg de Phenil Methil Sulfonul Fluoride em 1 mL de DMSO, 44,6 mg de Cloreto de Benzthonium, 372 mg de EDTA, 40 µL de aprotinina. Completar para 1 L com PBS 1x.

Tampão carbonato para sensibilização de IFN γ (ELISA): 1,83 g de Na₂CO₃.H₂O, 8,4 g de NaHCO₃ em 1 L de água destilada. Acertar o pH para 8,3.

Tampão citrato (ELISA): 13,41 g de NaHPO₄.7H₂O, 5,19 g de C₆H₈O₇ e água bidestilada para 1 L, acertando o pH para 5. Estocar a 4°C.

Tampão fosfato especial para sensibilização (ELISA): Solução A: NaH₂PO₄ 0,1 M em água destilada. Solução B: Na₂HPO₄.7H₂O 0,1 M em água destilada. Adicionar aproximadamente 80 mL da solução B em 500 mL da solução A até o pH atingir 6,0.

Tampão da Amostra (2X) (SDS-PAGE): 2,5 mL Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 2 mL de glicerol 100%, 0,4 mL de β -mercaptoetanol, 0,4 g de SDS, 0,02 g de azul de bromofenol e água milli-Q q.s.p 10 mL.

Tampão de amostra (gel de agarose): Glicerol 50%; Azul de bromofenol 0,20%; TBE 2,5X.

Tampão de corrida Tris-glicina (10X) (SDS-PAGE): 30 g de Tris-base, 144 g de Glicina, 10 g de SDS e água milli-Q q.s.p. 1 L (concentração de uso: 25 mM tris; 250 mM glicina; 0,1% SDS).

Tampão de Transferência (pH 8,3) (Western Blot): 3,03 g de Tris (25 mM), 14,4 g de glicina (192 mM), 200 mL de metanol ou etanol (20%) e água destilada q.s.p. 1 L.

TBE (10X) (gel de agarose): 54 g de Tris; 27,5 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0 - 8,5); água destilada q.s.p. 1L.

TE-LYS (Extração plasmideana de *L. lactis*): TE 0,5X (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 300 mM NaCl) e 10 mg/mL Lisozima.