

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



Tese de Doutorado

Utilização de uma linhagem invasiva de *Lactococcus lactis* como veículo para a entrega de um plasmídeo vacinal codificando o antígeno Ag85A de *Mycobacterium tuberculosis* a células mamíferas e avaliação do perfil de resposta imunológica gerado em modelo murino.

ORIENTADA: Pamela Mancha Agresti
ORIENTADOR: Prof. Dr. Anderson Miyoshi
COORIENTADORA: Dra. Sophie Leclercq

BELO HORIZONTE
Abril – 2014

Pamela Mancha Agresti

Tese de Doutorado

Utilização de uma linhagem invasiva de *Lactococcus lactis* como veículo para a entrega de um plasmídeo vacinal codificando o antígeno Ag85A de *Mycobacterium tuberculosis* em células mamíferas e avaliação do perfil de resposta imunológica gerado em modelo murino.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Anderson Miyoshi

COORIENTADORA: Dra. Sophie Leclercq

BELO HORIZONTE

Abril – 2014

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. **Dr. Anderson Miyoshi**, pela oportunidade, esclarecimento de “muitas” dúvidas, ajuda incondicional, orientação e confiança depositada. Muito Obrigada Anderson.

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

À Dra. **Sophie Leclercq**, pela orientação e momentos compartilhados.

Aos componentes da **banca** examinadora, por aceitarem o convite.

A **CAPES**, pela bolsa de estudo concedida.

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

Aos colegas e amigos do **LGCM**

Às meninas do grupo pValac, especialmente a **Fernanda Alvarenga Lima**, pelo coleguismo e pelos bons momentos compartilhados. À **Camila Prósperi de Castro**, quem além de todo o coleguismo e amizade, se disponibilizou incondicionalmente a me ajudar com muito carinho.

A meus queridos amigos **Sara Viguetti** e **Wanderson Marques Silva** por todo o apoio e amizade.

Aos colegas da **FUNED**, especialmente à **Dra. Janete Santos**, pela imensa ajuda e boa vontade em auxiliar os experimentos de Cultura Celular.

À minha **Família**, meus filhos **Victoria e Santiago**, meu esposo **Adrian** e à minha mãe **Dori**, por todo o amor que me brindam dia a dia. Amo muito vocês! Obrigada!!!!!!

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS | I |
| LISTA DE TABELAS | III |
| LISTA DE ABREVIATURAS | IV |
| RESUMO..... | VIII |
| ABSTRACT..... | IX |
| 1. APRESENTAÇÃO | 1 |
| 1.1 Colaborações | 2 |
| 1.2 Introdução Geral..... | 3 |
| 1.3 Estrutura da Tese..... | 7 |
| 2. INTRODUÇÃO | 8 |
| 2.1 Vacinas de DNA | 9 |
| 2.1.1 Vantagens das vacinas de DNA | 10 |
| 2.1.2 Vacinas de DNA Aprovadas e em Ensaios Clínicos | 13 |
| 2.1.3 Estrutura dos Plasmídeos para Vacinas de DNA..... | 13 |
| 2.1.4 Otimização da Imunogenicidade Das Vacinas Gênicas..... | 17 |
| 2.1.5 Mecanismo de Ação das Vacinas de DNA | 19 |
| 2.1.7 Vias de Entrega das Vacinas de DNA | 23 |
| 2.1.8 Imunidade das mucosas..... | 26 |
| 2.1.9 Bactérias na Entrega de Vacinas de DNA | 32 |
| 2.2 Bactérias Lácticas | 35 |
| 2.2.1 Características das Bactérias Lácticas | 35 |
| 2.2.2 <i>Lactococcus lactis</i> : a Bactéria Láctica Modelo..... | 37 |
| 2.2.3 Utilizações Biotecnológicas de <i>Lactococcus lactis</i> | 37 |
| 2.3 Tuberculose..... | 43 |
| 2.3.1 Generalidades | 43 |
| 2.3.2 Patologia e Imunidade | 44 |
| 2.3.3. Diagnostico, tratamento e prevenção..... | 51 |
| 2.3.4 Origem da BCG | 51 |
| 2.3.5 Possíveis Sucessores ou Potenciadores da BCG Como Futuros Candidatos Vacinais .. | 53 |
| 2.3.6 O Complexo Antigênico Ag85..... | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 3. OBJETIVOS | 59 |
| 3.1 Objetivo Geral | 60 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 60 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 61 |
| 4.1 Linhagens Bacterianas, Plasmídeos, Condições de Cultivo e Estocagem..... | 62 |
| 4.2 Manipulação do DNA..... | 63 |
| 4.3 Resolução Eletroforética..... | 64 |
| 4.4 Isolamento da ORF Ag85A..... | 64 |
| 4.5 Clonagem da ORF Ag85A no Sistema Zero Blunt® TOPO®..... | 67 |
| 4.5.1 Confeção de Escherichia coli Eletrocompetente | 67 |
| 4.5.2 Transformação de Escherichia coli Top10 com pTP:Ag85A | 68 |
| 4.5.3 Extração do DNA plasmideano pTP:Ag85A de Escherichia coli Top10 | 70 |
| 4.5.4 Confirmação da Presença e do Peso Molecular do Inseto Ag85A no Plasmídeo Zero Blunt® TOPO®..... | 71 |
| 4.6 Subclonagem da ORF Ag85a no Plasmídeo pValac..... | 71 |
| 4.6.1 Extração do Plasmídeo pValac:gfp..... | 71 |
| 4.6.2 Digestão Enzimática do Plasmídeo pValac:gfp..... | 72 |
| 4.6.3 Purificação do fragmento referente ao vetor pValac digerido..... | 73 |
| 4.6.4 Digestão Enzimática do Plasmídeo pTP:Ag85A e Purificação do Fragmento de DNA Referente à ORF Ag85A..... | 73 |
| 4.6.5 Ligação da ORF Ag85A no Vetor pValac..... | 74 |
| 4.6.6 Transformação de Escherichia coli TG1 com o plasmídeo pValac:Ag85A..... | 74 |
| 4.6.7 Confirmação da Presença e Peso Molecular do Inseto Ag85A no Vetor pValac..... | 75 |
| 4.6.8 Reação de Sequenciamento e Análises in Silico | 76 |
| 4.7 Verificação da Funcionalidade do Plasmídeo pValac:Ag85A em Cultura de Células Mamíferas | 77 |
| 4.7.1 Cultura de Células CHO (Chinese Hamster Ovary) | 77 |
| 4.7.2 Transfecção de Células CHO com o Plasmídeo pValac:Ag85A | 78 |
| 4.7.3 Verificação da Funcionalidade do Plasmídeo pValac:Ag85A em Cultura de Células Mamíferas | 80 |
| 4.8 Obtenção de <i>Lactococcus lactis</i> FnBPA ⁺ Carreando o Vetor pValac:Ag85A. | 84 |
| 4.8.1 Confeção de Células Eletrocompetentes de <i>L. lactis</i> FnBPA ⁺ | 84 |
| 4.8.2 Transformação de <i>L. lactis</i> FnBPA ⁺ com o Plasmídeo pValac:Ag85A..... | 85 |
| 4.8.3 Extração do DNA Plasmideano de <i>L. lactis</i> FnBPA ⁺ (pValac:Ag85A)..... | 86 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.8.4 | Confirmação dos Clones <i>L. lactis</i> FnBPA+ Carreadores do Plasmídeo pValac:Ag85 | 86 |
| 4.9 | Padronização das Curvas de Crescimento Bacteriano Para os Experimentos de Imunização | 87 |
| 4.10 | Ensaio de Imunização com a Linhagem <i>L. lactis</i> FnBPA (pValac:Ag85A) e avaliação da Resposta Imune Gerada | 88 |
| 4.10.1 | Animais Utilizados Para os Experimentos de Imunização..... | 88 |
| 4.10.2 | Imunização dos Camundongos C57BL/6..... | 89 |
| 4.10.3 | Coleta do Soro dos Animais Imunizados | 90 |
| 4.10.4 | Processamento do Baço para Cultura de Células e Dosagem de Citocinas | 91 |
| 4.10.5 | Caracterização do Perfil da Resposta Imune Humoral | 92 |
| 4.10.6 | Caracterização do Perfil da Resposta Imune Celular..... | 93 |
| 4.11 | Análises Estatísticas..... | 94 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 95 |
| 5.1 | Clonagem da ORF Ag85A no vetor pValac..... | 96 |
| 5.1.1 | Amplificação da ORF Ag85A | 96 |
| 5.1.2 | Clonagem da ORF Ag85A no sistema Zero Blunt® TOPO®..... | 97 |
| 5.1.3 | Clonagem da ORF Ag85A no vetor pValac | 99 |
| 5.1.4 | Reação de sequenciamento e análises in silico..... | 102 |
| 5.2 | Verificação da Funcionalidade do Plasmídeo pValac:Ag85A em Cultura de Células Mamíferas | 104 |
| 5.2.1 | Padronização da Transfecção Celular com o plasmídeo pValac:gfp | 104 |
| 5.2.2 | Verificação da Produção, por Células Mamíferas da Linhagem CHO, da Proteína Ag85A | 105 |
| 5.3 | Obtenção da Linhagem Invasiva <i>L. lactis</i> FnBPA ⁺ Carreando o Vetor pValac:Ag85A..... | 111 |
| 5.3.1 | Transformação da Linhagem Invasiva <i>L. lactis</i> FnBPA ⁺ com Vetor pValac:Ag85A | 111 |
| 5.3.2 | Transformação da Linhagem Invasiva <i>L. lactis</i> FnBPA ⁺ com o Vetor pValac:gfp | 112 |
| 5.4 | Padronização das Curvas de Crescimento de Diferentes Linhagens de <i>L. lactis</i> para Imunização dos Animais | 114 |
| 5.5 | Imunização de Camundongos C57BL/6 com as Diferentes Linhagens de <i>L. lactis</i> | 116 |
| 5.5.1 | Caracterização do Perfil da Resposta Imune Celular..... | 116 |
| 5.5.2 | Caracterização do Perfil da Resposta Imune Humoral dos Animais Imunizados | 126 |
| 7. | CONCLUSÕES | 136 |
| 8. | PERSPECTIVAS..... | 138 |
| 8.1 | Perspectivas..... | 139 |
| 9. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 140 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figure 1: Representação esquemática de um plasmídeo vacinal.. | 14 |
| Figure 2: Representação Esquemática da Indução da Imunidade Celular e Humoral por Vacinas de DNA..... | 21 |
| Figure 3: Tecido linfóide faríngeo e anéis de Waldeyer.. | 29 |
| Figure 4: Representação esquemática da transferência de um plasmídeo vacinal de uma bactéria invasiva atenuada para uma célula eucariótica.. | 33 |
| Figure 5: Fluxo da infecção por micobactérias..... | 46 |
| Figure 6: Representação esquemática de um alvéolo adjacente a um granuloma sólido | 48 |
| Figure 7: Representação esquemática de transmissão e difusão de <i>M. tuberculosis</i> em granuloma caseoso..... | 50 |
| Figure 8: Representação esquemática do vetor Zero Blunt® TOPO®..... | 69 |
| Figure 9: Representação esquemática do vetor de expressão eucariótica pValac:gfp.. | 73 |
| Figure 10: Esquemática das imunizações e coletas do sangue dos camundongos com as linhagens vacinais de <i>L. lactis</i> | 91 |
| Figure 11: Análise do produto de amplificação por PCR da ORF Ag85A de <i>M. tuberculosis</i> | 97 |
| Figure 12: Amplificação por PCR da ORF Ag85A de <i>M. tuberculosis</i> e digestão enzimática a partir do DNA plasmideano extraído de células de <i>E. coli</i> transformadas com o plasmídeo pTP:Ag85A..... | 99 |
| Figure 13: Análise do produto da extração plasmideana, digestão do pValac:gfp e purificação do vetor <i>pValac</i> | 100 |
| Figure 14: Análise do produto de amplificação por PCR da ORF Ag85A de <i>M. tuberculosis</i> e confirmação da presença da ORF Ag85A no vetor pValac por digestão enzimática..... | 102 |
| Figure 15: Sequência nucleotídica obtida através do sequenciamento do inserto contido no vetor pValac..... | 103 |

| | |
|--|-----|
| Figure 16: Resultado da padronização transfecção das células Flp-InTM-CHO (Invitrogen) com o plasmídeo pValac:gfp..... | 105 |
| Figure 17: Imunocitoquímica utilizando-se microscopia confocal para confirmar a produção da proteína Ag85A em células da linhagem CHO..... | 107 |
| Figure 18: Detecção da produção da proteína verde fluorescente (GFP) por citometria de fluxo (FACScan)..... | 109 |
| Figure 19: Verificação da produção da proteína Ag85A em células CHO por citometria de fluxo (FACScan)..... | 111 |
| Figure 20: Confirmação da obtenção da linhagem <i>L. lactis</i> FnBPA+(pValac:Ag85A) e <i>L. lactis</i> FnBPA+(pValac:gfp)..... | 114 |
| Figure 21: Curvas de crescimento de diferentes linhagens de <i>Lactococcus lactis</i> | 115 |
| Figure 22: Produção da citocina IFN- γ em cultura de células do baço dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> | 118 |
| Figure 23: Produção da citocina TNF- α em cultura de células do baço dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> | 120 |
| Figure 24: Produção da citocina IL-6 em cultura de células do baço dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de <i>L.lactis</i> | 122 |
| Figure 25: Produção da citocina IL-10 em cultura de células do baço dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de <i>L. Lactis</i> | 124 |
| Figure 26: Determinação da produção de anticorpos IgG anti-Ag85A..... | 128 |
| Figure 27: Determinação da produção de anticorpos IgG1 anti-Ag85A..... | 129 |
| Figure 28: Determinação da produção de anticorpos IgA anti-Ag85A..... | 131 |
| Figure 29: Determinação da produção de anticorpos IgG anti-Ag85A..... | 132 |
| Figure 30: Determinação da produção de anticorpos IgA anti-Ag85A..... | 134 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Vantagens na utilização das vacinas de DNA. | 12 |
| Tabela 2: Vantagens e desvantagens da vacinação intranasal..... | 25 |
| Tabela 3: Principais candidatos vacinais em ensaios clínicos..... | 54 |
| Tabela 4: Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados..... | 62 |
| Tabela 5: Sequencias dos Iniciadores utilizados nas diferentes reações de PCR reslizadas neste trabalho. | 66 |
| Tabela 6: Condições das reações de PCR utilizadas para amplificar a ORF Ag85A de <i>M. tuberculosis</i> | 67 |
| Tabela 7: Condições da PCR utilizadas para amplificar a ORF FnBPA do plasmídeo pOri23 pertencente à linhagem <i>L.lactis</i> invasiva. | 87 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | | |
|-----------------------|---|--|
| ADCC | - | Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo, do inglês: <i>Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i> |
| AIDS | - | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês: <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> |
| aa | - | Aminoácidos |
| Amp | - | Ampicilina |
| APC | - | Célula Apresentadora de Antígeno, do inglês: <i>Antigen Presenting Cell</i> |
| BAL | - | Lavagem Broncoalveolar |
| BCG | - | Bacilo Calmette-Guérin |
| BGH | - | Hormônio do Crescimento Bovino |
| BHI | - | Meio de cultura “Infusão de Cérebro e Coração” |
| BL | - | Bactéria Láctica |
| BLAST | - | Programa de Alinhamento de sequencias de DNA |
| BLG | - | β -Lactoglobulina |
| BSA | - | Albumina Sérica Bovina |
| CBA | - | do inglês: <i>Citometric Beads Array</i> |
| CFP-10 | - | Proteína do Filtrado da Cultura de 10-kDa |
| CHO | - | Célula de Ovário de Hamster Chinês |
| Cm | - | Cloranfenicol |
| CMV | - | Citomegalovírus |
| CO₂ | - | Dióxido de Carbono |
| CPG | - | Citosina-Fosfato-Guanina |
| DAPI | - | 4,6'-diamidino-2-phenilindol |
| DC | - | Células Dendríticas, do inglês: <i>Dendritic Cells</i> |
| DMSO | - | Dimetilsulfóxido |
| DNA | - | Ácido desoxirribonucleico, do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i> |
| DNase | - | Desoxirribonuclease |
| dNTPs | - | Desoxirribonucleotídeos trifosfatados, do inglês: <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i> |

| | | |
|---------------|---|--|
| DO | - | Densidade Óptica |
| EDTA | - | Ácido etilenodiaminotetracético |
| ELISA | - | Enzaio Imunoenzimatico, do inglês: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| Ery | - | Eritromicina |
| F | - | Oligonucleotídeo senso, do inglês: <i>Forward</i> |
| BAFF | - | Fator ativador de células B, do inglês: <i>B Cell-Activating Factor</i> |
| FAE | - | Folículo Associado as Epitélio, do inglês: <i>Follicle-Associated Epithelium</i> |
| FACS | - | “ <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> ”, applied in flow cytometry |
| FDA | - | Administração para Alimentos e Drogas, do inglês: <i>Food and Drugs Administration</i> |
| FL-1 | - | Fluorescência do tipo 1 |
| FnBPA | - | Proteína de ligação à Fibronectina A |
| FSC | - | Fotosensor de Dispersão Frontal, do inglês: <i>Forward scatter</i> |
| GFP | - | Proteína Verde Fluorescente, do inglês: <i>Green Fluorescent Protein</i> |
| GM-CSF | - | Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos e Macrófagos |
| GRAS | - | “Geralmente reconhecidos como seguros” |
| HEPES | - | Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1 |
| HPLC | - | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês: <i>High-performance liquid chromatography</i> |
| HIV | - | Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês: Human Immunodeficiency Virus |
| Ig | - | Imunoglobulina |
| sIgA | - | Imunoglobulina A secretória |
| InIA | - | Internalina A |
| IL | - | Interleucina |
| IFN | - | Interferon |
| kb | - | Quilo Bases |
| kDa | - | Quilo Daltons |
| LB | - | Meio de cultura “ <i>Luria-Bertani</i> ” |

| | | |
|--------------------|---|---|
| LPS | - | Lipopolissacarídeo |
| LT | - | Tonsilas Linguais, do inglês: <i>Lingual Tonsils</i> |
| MALT | - | Tecido Linfóide Associado à Mucosa, do inglês: <i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissues</i> |
| M17-Sac-Gli | - | Meio de cultura “M17 Sacarose Glicose” |
| MCS | - | Sítio Múltiplo de Clonagem, do inglês: <i>Multiple Cloning Site</i> |
| MDR-TB | - | Linhagens de <i>M. tuberculosis</i> Multidrogas Resistentes |
| MFI | - | Mediana da Intensidade de Fluorescência |
| MHC | - | Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês: <i>Major Histocompatibility Complex</i> |
| MPs | - | Células Fagocíticas Mononucleares |
| NALT | - | Tecido Linfóide Nasofaríngeo, do inglês: <i>Nose Associated Lymphoid Tissue</i> |
| NCBI | - | Centro Nacional de Informações Biotecnológicas, do inglês: <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NICE | - | Sistema de Expressão Controlado por Nisina, do inglês: <i>Nisin gene controlled gene system</i> |
| NT | - | Tonsilas Nasofaríngeas ou Adenoides, do inglês: <i>nasopharyngeal tonsil</i> |
| NTM | - | Bactérias Não Tuberculosas |
| NK | - | Células <i>Natural Killer</i> |
| OPD | - | Ortofenilendiamino |
| ORF | - | Fase de Leitura Aberta, do inglês: <i>Open Reading Frame</i> |
| PAMPs | - | Padrões Moleculares Associados aos Patógenos, do inglês: <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> |
| pb | - | Pares de Base |
| PBS | - | Tampão Salina Fosfato, do inglês: <i>Phosphate Bufferd Saline</i> |
| pCMV | - | Promotor do Citomegalovírus |
| PCR | - | Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PEG3000 | - | Polietileno glicol 3000 |

| | | |
|-----------------|---|---|
| poli-A | - | Sequência Sinal de Poliadenilação |
| PPD | - | Derivado Protéico Purificado, do inglês: <i>Tuberculin Purified Protein Derivative</i> |
| PSA | - | Persulfato de Amônio |
| PS | - | Peça Secretora |
| pSV40 | - | Promotor do vírus SV40 |
| PE | - | Ficoeritrina |
| PT | - | Tonsilas Palatinas, do inglês: <i>Palatine Tonsils</i> |
| pRSV | - | Promotor do Rous vírus |
| pValac | - | Plasmídeo " <i>Vaccination using lactic acid bacteria</i> " |
| R | - | Oligonucleotídeo anti-senso, do inglês: <i>Reverse</i> |
| RE | - | Retículo Endoplasmático |
| RNA | - | Ácido ribonucleico, do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i> |
| RNase A | - | Ribonuclease A |
| SDS | - | Dodecilsulfato de sódio |
| SDS-PAGE | - | Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida-SDS |
| SSC | - | Fotosensor de Dispersão Lateral, do inglês: <i>Side Scatter</i> |
| TB | - | Tuberculose |
| TBE | - | Tris-borato-EDTA |
| TCR | - | Receptor de Célula T, do inglês: <i>T cell receptor</i> |
| TE-LYS | - | Tris-EDTA-Lisozima |
| TGF-β | - | Fator de Crescimento Transformante-β, do inglês: <i>Transforming growth factor-beta</i> |
| TFH | - | Células T helper Foliculares do inglês: <i>T follicular helper cells</i> |
| TL | - | Tuberculose Latente |
| TLR | - | Receptores Toll Like, do inglês: <i>Toll Like Receptors</i> |
| TNF-α | - | Fator de Necrose Tumoral, do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor</i> |
| Tris | - | Tris(hidroximetil)aminometano |
| TST | - | Test Tuberculínico, do inglês: <i>Tuberculin Skin Test</i> |
| TTFC | - | Fragmento C da Toxina Tetânica, do inglês: <i>tetanus toxic fragment</i> |

C

- TT** - Tonsilas Tubais, do inglês: *Tubal Tonsils*
- U** - Unidades
- UFC** - Unidade Formadora de Colônia
- Usp45** - Proteína secretada desconhecida de *45 kDa*
- WHO** - Organização Mundial da Saúde, do inglês: *World Health Organization*

- Ω** - Ohm (resistência)
- μF** - Microfarad (capacitância)
- XDR-TB** - Linhagens de *M. tuberculosis* Extensivamente Droga-Resistentes
- XIES** - Sistema de Expressão Induzido por Xilose, do inglês: *Xylose-Inducible Expression System*

RESUMO

O uso de bactérias como veículos para a entrega de plasmídeos vacinais por via das mucosas constitui uma estratégia de vacinação promissora. Neste contexto, bactérias patogênicas atenuadas como *Shigella*, *Yersinia*, *Listeria* e *Salmonella* vêm sendo utilizadas para a entrega de plasmídeos vacinais às células mamíferas, embora apresentem risco de reversão ao seu fenótipo patogênico. Visando contornar este problema, a utilização de bactérias não patogênicas, tais como as Bactérias Lácticas (BL), vem sendo proposta. Dentro do grupo das BL, *Lactococcus lactis* vem sendo extensivamente utilizado para a produção e entrega de antígenos e citocinas em nível de mucosas. Estudos envolvendo esta bactéria têm também focado em sua utilização como veículo para entrega de vacinas gênicas, sendo desenvolvidas linhagens invasivas de *L. lactis* para aumentar a eficiência de entrega das referidas vacinas às células do hospedeiro. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um plasmídeo replicativo em *L. lactis*, contendo um cassete de expressão eucariótica, o pValac (*Vaccination using lactic acid bacteria*). Assim, o uso de linhagens invasivas de *L. lactis* para a entrega do vetor pValac expressando o antígeno Ag85A de *M. tuberculosis*, poderia representar uma nova estratégia para o controle da tuberculose. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi a construção do plasmídeo vacinal pValac:Ag85A e a verificação de sua funcionalidade *in vitro*, utilizando células eucarióticas da linhagem CHO (*Chinese Hamster Ovary*), bem como sua clonagem na linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA⁺, gerando assim, a linhagem *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A). Esta linhagem, por sua vez, foi utilizada em experimentos de imunização de camundongos C57BL/6 e as respostas imunes humoral e celular, geradas pela mesma, foram avaliadas. Como um todo, observou-se uma polarização da resposta imune para o padrão Th1, nos animais imunizados com a referida linhagem em relação aos animais dos grupos controles. Além disso, observou-se a produção das imunoglobulinas IgG e sIgA nas mucosas, especificamente na mucosa respiratória. Em suma, este projeto constitui um primeiro passo rumo à validação da eficácia e efetividade de novas vacinas gênicas baseadas em bactérias lácticas geneticamente modificadas, por via de administração em mucosas.

ABSTRACT

Using bacteria as a vehicle for orally delivering vaccines plasmids is considered a promising vaccination strategy. Thus, attenuated pathogenic bacteria, such as *Shigella*, *Yersinia*, *Listeria* and *Salmonella* are being used for delivering plasmids of vaccine type to mammal cells. However, there is a risk of reversing to its wild phenotype. In order to counteract this problem, we propose the use of non pathogenic bacteria, as lactic bacteria (BL). Within the group of lactic bacteria, the *Lactococcus lactis* is deemed as a model microorganism, which is being extensively used for antigen and cytokines production and delivery to the mucosal level. Recently studies about this bacteria have focused on their usage as vehicles for the delivery of genic vaccines. For this, invasive strains of *L. lactis* have been developed in order to increase the delivery efficiency of these vaccines to host cells. Furthermore, our investigation team developed a plasmid that replicates in *L. lactis* and contains a eukaryotic expression cassette named pValac (*V*accination using *l*actic *a*cid *b*actéria). In this way, the use of invasive strains of *L. lactis* for the delivery of vector pValac expressing the antigen Ag85A of *Mycobacterium tuberculosis* could represent a new strategy for controlling tuberculose. The aim of this investigation was not only the development of plasmid vaccine pValac:Ag85A and its functional evaluation *in vitro* but also its clonation in its *L. lactis* FnBPA⁺ invasive strain for using this system as a potential genic vaccine. The highly functional performance of the eukaryotic expression cassette when coding antigen Ag85A was confirmed through the detection of Ag85A protein through of immunocytochemistry; and flow cytometry after transfecting pValac within mammalian cells. Finally, plasmid pValac:Ag85A was transformed into invasive *L. lactis* strain, originating *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A) strain. This strain was used in C57BL/6 mice intranasal immunization. The humoral and cellular immune responses were evaluated. We observed a polarization of the immune response towards a Th1, in immunized mice with it strain. In the respiratory mucosal, we detected production of both, IgG and sIgA, antibody. In this way, this project is the first step towards the effective validation of new genetic vaccines based on lactic bacteria genetically modified administered in mucosal level.

1. APRESENTAÇÃO

1.1 Colaborações

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito de uma colaboração interinstitucional entre o Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e o Laboratório de Inovação Biotecnológica (LIB) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, Minas Gerais. Esta colaboração se deu devido ao interesse mútuo dos laboratórios acima citados em promover o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas e terapêuticas para as bactérias lácticas. Este trabalho foi desenvolvido sob orientação do Professor Doutor Anderson Miyoshi (LGCM – UFMG) e co-orientação da Doutora Sophie Leclercq (LIB – FUNED) e contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

1.2 Introdução Geral

Diversos agentes infecciosos invadem o hospedeiro através da superfície de mucosas para causar doenças, sendo que a microbiota do trato gastrointestinal atua como um estímulo primário para a ativação do sistema imune de mucosas (Deplancke e Gaskins, 2002; Macfarlane e Cummings, 2002). Assim, o uso de bactérias como veículos para a entrega de plasmídeos vacinais pela rota oral constitui uma estratégia de vacinação promissora contra um amplo 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 de expressão eucariótica às células de mamíferos (Daudel, Weidinger e Spreng, 2007). Após essas bactérias invadirem as células epiteliais e serem fagocitadas, o plasmídeo consegue escapar da vesícula e alcançar o núcleo da célula hospedeira, resultando na expressão da ORF (do inglês, *Open Reading Frame*) de interesse e posterior apresentação antigênica (Grillot-Courvalin, Goussard e Courvalin, 1999). Contudo, esses microorganismos apresentam riscos de reversão ao seu fenótipo selvagem, ou seja, podem voltar a serem patogênicos, não sendo, assim, totalmente seguros para uso humano, especialmente se tratando de crianças e pacientes imunocomprometidos (Dunham, 2002) situação esta que pode ser contornada pela utilização de bactérias não patogênicas.

Neste contexto, o uso de Bactérias Lácticas (BL) como veículos para a entrega de plasmídeos vacinais representaria uma alternativa atrativa em relação à utilização de patógenos atenuados (Wells e Mercenier, 2008). As BL constituem um grupo diverso de microorganismos Gram-positivos, capazes de converter açúcares em ácido láctico. Dentre os representantes deste grupo de bactérias, *Lactococcus lactis* é a espécie mais bem caracterizada e figura como um microrganismo modelo no estudo dos mesmos, não só por sua importância econômica, como na indústria de laticínios, mas também devido ao fato de ser um microorganismo de fácil manipulação, ser considerado seguro (GRAS, do inglês *Generally Recognized As Safe*), ter o seu genoma completamente sequenciado e possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (Bolotin *et al.*, 2001; Azevedo e Miyoshi, 2004; Bahey-El-

Din e Gahan, 2010). Há muito, moléculas heterólogas de interesse médico e biotecnológico vêm sendo produzidas em *L. lactis* (Wells e Mercenier, 2008) e, atualmente, o uso desta bactéria como um veículo para a entrega de plasmídeos vacinais tem se mostrado bastante promissor.

Neste contexto, uma linhagem recombinante de *L. lactis*, expressando a proteína de ligação Fibronectina A (FnBPA) de *Staphylococcus aureus* (Que *et al.*, 2001), foi testada a fim de melhorar e facilitar a entrega do DNA às células mamíferas (Innocentin *et al.*, 2009). A proteína 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 vetor de expressão eucariótica funcional à linhagem celular Caco-2 (Innocentin *et al.*, 2009) de forma muito mais eficiente que a linhagem de *L. lactis* selvagem. Além disso, um novo plasmídeo, denominado pValac (Vaccination using lactic acid bacteria), de 3.742 pb, foi construído por nosso grupo de pesquisa. 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 do Hormônio Bovino de Crescimento (BGH poli-A), que visa 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 antibiótico cloranfenicol (Cm), para seleção das linhagens recombinantes (Guimarães *et al.*, 2009). Assim, a utilização de linhagens invasivas de *L. lactis* para a entrega do vetor 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 pela bactéria *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 no mundo (Lugo e Bewley, 2008). A Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês World Health Organization) na reunião “*Global reporter control*”, realizada em 2011, declarou uma incidência de 8,8 milhões de novos casos de TB, com 1,1 milhões de mortes entre pessoas HIV negativas e um adicional de 350.000 óbitos associados às pessoas HIV positivas, naquele ano (WHO, 2011). O tratamento desta

doença consiste na administração de múltiplos antibióticos durante um período de tempo prolongado, que geralmente não é seguido pelos pacientes, contribuindo para a seleção de linhagens resistentes a múltiplas drogas; o que por sua vez, torna esta medida pouco eficaz. Além da quimioterapia convencional, a doença pode ser controlada utilizando-se a única vacina licenciada para uso clínico, a BCG (Bacillus Calmette-Guérin). Embora venha sendo amplamente utilizada no Brasil e em outros países, a eficácia da BCG ainda permanece controversa. Esta vacina protege contra as formas mais graves da doença, como tuberculose miliar e meníngea em crianças, entretanto, sua eficácia contra a TB pulmonar em pacientes adolescentes e adultos varia de 0 a 80% (Brewer, 2000; Britton e Palendira, 2003; Liu *et al.*, 2009). São consideradas várias razões para esta eficácia variável, incluindo diferenças entre sublinhagens de BCG, exposição à micobactérias não tuberculosas (NTMs), estado nutricional, assim como, também o *background* genético da população e, finalmente, variações entre as diferentes linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* (WHO 2004; Mendoza *et al.*; 2011). Dessa maneira, estratégias para o desenvolvimento de novas vacinas mais eficazes e economicamente viáveis visando combater esta doença 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, são as primeiras a estabelecerem um contato com o sistema imunológico do hospedeiro. As proteínas do complexo Ag85 – Ag85 A, B e C – constituem as principais proteínas secretadas (aproximadamente 30%) por *M. tuberculosis* encontradas nos filtrados de cultura (Wiker *et al.*, 1992). As proteínas do referido complexo são fortemente imunogênicas devido ao fato de as mesmas serem capazes de estimular tanto uma resposta imune humoral quanto celular. A diferença existente entre a eficiência das vacinas feitas com micobactérias vivas e as vacinas feitas com micobactérias mortas é devida aos antígenos secretados pelo microorganismo. Neste caso, as vacinas vivas, após inoculação, seriam capazes de liberar constituintes do complexo antigênico 85, dentre outras proteínas secretadas, resultando assim, em uma maior estimulação do sistema imune (Wiker *et al.*, 1992).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a construção do plasmídeo vacinal pValac codificando o antígeno Ag85A de *M. tuberculosis* e sua entrega às células mamíferas através da utilização de linhagens recombinantes de *L. lactis* FnBPA⁺ contendo o referido plasmídeo, o que poderá representar uma futura estratégia para o desenvolvimento de uma nova formulação vacinal, mais segura, eficaz e econômica, contra a TB.

1.3 Estrutura da Tese

Este manuscrito apresenta, em sua primeira seção, uma revisão de literatura dividida em três assuntos principais: (i) as vacinas de DNA, seu mecanismo de ação, suas vantagens e suas principais vias de entrega; (ii) as Bactérias Lácticas (BL) como veículos para entrega de plasmídeos vacinais, especialmente no que concerne ao uso de linhagens invasivas de *Lactococcus lactis* e (iii) as características do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*; a Tuberculose como sendo uma doença re-emergente no mundo e as vacinas em desenvolvimento contra esta doença, explorando principalmente o potencial da proteína Ag85A como antígeno vacinal. Em seguida, encontram-se os objetivos do trabalho e a metodologia utilizada para o desenvolvimento do mesmo e, posteriormente, os resultados obtidos até o momento bem como a discussão dos mesmos. Por fim, as conclusões e perspectivas do presente trabalho serão expostas, seguindo-se das referências bibliográficas e anexos.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Vacinas de DNA

Muitos avanços ocorreram desde 1798, quando o médico inglês Edward Jenner (1749 – 1823) imunizou um garoto de oito anos, James Phipps, contra a varíola e criou o que, anos mais tarde, ficou conhecido como "vacina" (Stewart e Devlin, 2006; Azizi, 2010). Desde as primeiras vacinas vivas atenuadas ou mortas até a nova era das vacinas de DNA, no início dos anos 1990, a biologia molecular e microbiologia têm ajudado no controle e na profilaxia de diversas doenças infecciosas, cânceres, alergias e doenças auto-imunes, induzindo rápida e eficiente resposta imune ou criando tolerância imunológica (Ferrera *et al.*, 2007).

Dentre as atuais formulações vacinais, as “vacinas de DNA” são as mais recentes formas de vacinação e apresentam uma interessante alternativa para a apresentação de moléculas antigênicas ao sistema imune. Estas vacinas consistem na administração de plasmídeos 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), levando a apresentação destes ao sistema imune e subsequente proteção.

Os primeiros estudos que sugeriram que a injeção de uma vacina de DNA (“plasmídeo de DNA”), *in vivo*, poderia levar à expressão da sequência codificadora presente no plasmídeo e, em seguida, à produção da proteína de interesse, foram realizados por Ito (Ito, 1960). Sua pesquisa demonstrou que a injeção de DNA nu do papilomavírus em coelhos foi capaz de induzir tumores nesses animais. Além disso, Atanasiu e colaboradores obtiveram resultados semelhantes após a inoculação de hamsters com poliomavírus (Atanasiu, Orth e Dragonas, 1962), enquanto outros grupos relataram que utilizando técnicas similares, poderiam induzir miócitos cardíacos de ratos a expressar β -galactosidase recombinante (Wolff *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1990; Kitsis *et al.*, 1991).

A primeira evidência na literatura do uso imunológico de uma molécula de DNA, no entanto, somente seria apresentada em 1992, por Tang e colaboradores. Seus estudos mostraram que a injeção da sequência codificadora do hormônio do crescimento humano na pele de camundongos, usando a técnica de “*gene gun*”, foi

capaz de aumentar anticorpos específicos contra aquele hormônio, sugerindo que o DNA poderia ser utilizado também para induzir resposta imune contra infecções patogênicas (Tang, DeVit e Johnston, 1992). Naquele mesmo ano, durante a Reunião Anual de Vacinas no “*Cold Spring Harbor Laboratory*”, três outros grupos de pesquisa reportaram indução de imunidade celular e humoral em modelo murino, após a “imunização gênica”. Dois destes trabalhos comprovavam a geração de resposta imune contra o vírus influenza (Ulmer *et al.*, 1993; Fynan *et al.*, 1993) e o terceiro, contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Wang *et al.*, 1993). Posteriormente, resultados semelhantes foram obtidos após imunização de camundongos contra o herpesvirus bovino I (Cox, Zamb e Babiuk, 1993) e contra o vírus da raiva (Xiang *et al.*, 1994), reiterando o potencial imunogênico e protetor das vacinas de DNA.

2.1.1 Vantagens das vacinas de DNA

Assim como as vacinas baseadas em patógenos atenuados, as vacinas de DNA, são capazes de induzir imunidade humoral e celular, sem contudo, apresentarem os riscos associados a vacinas de patógenos atenuados. Assim, além de ser mais segura esta vacina, apresenta muitas outras vantagens sobre as vacinas tradicionais (Tabela 1).

Nestas vacinas, a síntese endógena do antígeno ocorre com características estruturais muito semelhantes à molécula nativa sintetizada pelo patógeno, criando condições para indução de respostas imunes mais efetivas (Silva *et al.*, 2004). Devido à sua estrutura simples, modificações na construção do plasmídeo vacinal podem ser feitas em um curto período de tempo e, tendo em vista que as vacinas de DNA podem ser facilmente replicadas em bactérias, é possível uma produção rápida, barata, e em larga escala (Kutzler e Weiner, 2008). Além disso, diferentemente das vacinas vivas e de subunidade, as vacinas gênicas são altamente estáveis e não requerem refrigeração, característica muito favorável à sua utilização sob condições oferecidas em países em desenvolvimento (Silva *et al.*, 2004).

Outra vantagem relevante que as vacinas gênicas apresentam sobre as demais estratégias vacinais é a possibilidade de se codificar mais de um antígeno em um

mesmo vetor vacinal (Capone *et al.*, 2006; Williams, Carnes e Hodgson, 2009), gerando as chamadas vacinas “multigenes” ou “multivalentes” (Gurunathan *et al.*, 2000a), que possibilitam imunizações simultâneas contra vários agentes infecciosos. Cabe ainda ressaltar que as vacinas de DNA oferecem a possibilidade de ser usadas terapêuticamente (Delavallée *et al.*, 2008).

Em relação ao seu perfil de segurança, estas não apresentam riscos de causar infecções, pois os plasmídeos expressam apenas genes específicos para determinada proteína antigênica (Oliveira, 2004) e assim, são capazes de direcionar a resposta imune apenas aos antígenos desejados para a imunização, com também de gerar memória imunológica (Lara e Ramirez, 2012).

Questões referentes à possibilidade de integração da vacina de DNA ao material genético do hospedeiro, bem como a geração de auto-imunidade em resposta às vacinas de DNA tem sido levantadas. Embora a taxa de integração ao genoma das vacinas de DNA seja considerada desprezível, isto é, 1.000 vezes menor que a taxa de mutação espontânea do DNA (Robinson *et al.*, 1997), pesquisas estão sendo desenvolvidas com o intuito de melhorar ainda mais a segurança destas vacinas, como por exemplo, avaliação de mecanismos reguladores (Xiao *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004).

Outra possível estratégia a ser desenvolvida são as vacinas de RNA, que embora difíceis de serem produzidas, não apresentam risco de integração no genoma da célula hospedeira (Schalk *et al.*, 2006). Com relação ao desenvolvimento da auto-imunidade, tem sido observada ausência de anticorpos anti-DNA no soro, após imunização gênica de camundongos (Xiang *et al.*, 1994; Parker *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2003), ratos (Tuomela *et al.*, 2005), coelhos (Parker *et al.*, 1999), peixes (Kanellos, *et al.*, 1999) como também em estudos pré-clínicos em primatas não humanos e nos primeiros estudos em seres humanos, não havendo assim evidência convincente do desenvolvimento de auto-imunidade em resposta à vacina de DNA (Bagarazzi *et al.*, 1997; MacGregor *et al.*, 1998; Le *et al.*, 2000; Klinman *et al.*, 2000; MacGregor *et al.*, 2000).

Outra questão de segurança levantada recai sobre a presença de gene de resistência a antibióticos, em particular a canamicina, não comumente utilizada para

tratar infecções humanas. Entretanto, estratégias alternativas ao uso de antibióticos como marcador de seleção vêm sendo amplamente exploradas (Mairhofer *et al.*, 1997; Cranenburgh *et al.*, 2001; Garmory *et al.*, 2005) como, por exemplo, a complementação auxotrófica (Williams, Carnes e Hodgson, 2009) e um sistema recentemente desenvolvido e testado em *Escherichia coli* que utiliza um gene essencial para o crescimento, *fabI*, e o biocida Triclosán como agente seletivo, permitindo a eficiente seleção de bactérias transformadas (Goh e Good, 2008; El-Attar *et al.*, 2011).

Tabela 1: Vantagens na utilização das vacinas de DNA.

| Características | |
|---------------------|--|
| Construção | <p>Modificações no plasmídeo vacinal podem se realizar em curto período de tempo</p> <p>Possibilidade de otimização dos plasmídeos e transcrito</p> <p>Utilização dos avanços da genômica para construção da vacina</p> |
| Tempo de manufatura | <p>Rápida produção</p> <p>Produção em larga escala</p> |
| Segurança | <p>Incapacidade de reversão a formas virulentas, como as vacinas vivas</p> <p>Diferentemente de algumas vacinas inativadas, a eficácia não depende de tratamentos tóxicos</p> <p>Nenhum efeito adverso significativo nos ensaios clínicos realizados até o momento foi reportado</p> |
| Estabilidade | <p>Maior termo-estabilidade em relação às outras vacinas</p> <p>Maior vida útil</p> |
| Mobilidade | <p>Fácil estocagem e transporte</p> <p>Não é necessária refrigeração constante</p> |
| Imunogenicidade | <p>Indução resposta imune celular e humoral, assim como as vacinas vivas</p> |

Fonte: Adaptado de Kutzler e Weiner, 2008

2.1.2 Vacinas de DNA Aprovadas e em Ensaios Clínicos

As vacinas de DNA constituem uma nova geração de produtos biotecnológicos utilizados tanto para fins profiláticos quanto para fins terapêuticos que estão apenas começando a entrar no mercado. Estas vacinas podem ser aplicadas como vacinas preventivas ou terapêuticas para doenças virais, bacterianas ou parasitárias, como também para o tratamento de câncer. Os progressos nesta área resultaram no desenvolvimento e comercialização de quatro vacinas de DNA licenciadas para uso veterinário, sendo uma delas contra o vírus do Nilo Ocidental, que infecta cavalos (Davidson *et al.*, 2005), outra contra o vírus da necrose hematopoiética infecciosa em salmões (Garver, LaPatra e Kurath, 2005), uma terceira vacina para tratamento de melanoma canino (Bergman *et al.*, 2006) e, finalmente, uma vacina terapêutica relacionada à liberação do fator de crescimento em suínos (Thacker *et al.*, 2006). Tais licenciamentos se apresentam como uma importante validação dessa plataforma vacinal, visto que ilustram seu potencial comercial (Kutzler e Weiner, 2008).

Com relação à utilização das vacinas de DNA em seres humanos, os resultados positivos obtidos através de estudos pré-clínicos em diferentes modelos animais, inclusive primatas, proporcionaram o acúmulo de dados sobre a eficácia e a segurança dessas formulações, permitindo o início dos testes clínicos (Silva *et al.*, 2004). Assim sendo, apesar de ainda não existirem produtos licenciados para uso humano, diversos ensaios clínicos utilizando vacinas de DNA estão sendo conduzidos, sendo que muitos destes têm se concentrado no combate à AIDS e no tratamento e prevenção de diversos tipos de câncer e doenças autoimunes (www.clinicaltrials.gov; acesso em fevereiro/2014). Estes testes têm demonstrado que as vacinas de DNA são bem toleradas e seguras, uma vez que não foram relatados eventos adversos significativos em vários dos estudos já concluídos (Liu e Ulmer, 2005; Liu, 2011).

2.1.3 Estrutura dos Plasmídeos para Vacinas de DNA

As vacinas de DNA são baseadas na tecnologia do DNA recombinante, compostas por plasmídeos que codificam genes frequentemente relacionados à

virulência ou patogencidade de agentes infecciosos. Os plasmídeos contêm um gene de resistência a um determinado antibiótico, controlado por um promotor procariótico, e uma origem procariótica de replicação, permitindo, respectivamente, a seleção e replicação dos plasmídeos em bactérias transformadas. A unidade de transcrição é geralmente composta por um promotor viral forte e constitutivo, que confere um alto nível de expressão da ORF (do inglês, *Open Reading Frame*) de interesse em células eucarióticas, e uma sequência sinal de poliadenilação, para estabilização do transcrito (Figura 1) (Feltquate, 1998; Gurunathan, Klinman e Seder, 2000b; Junior *et al.*, 2004).

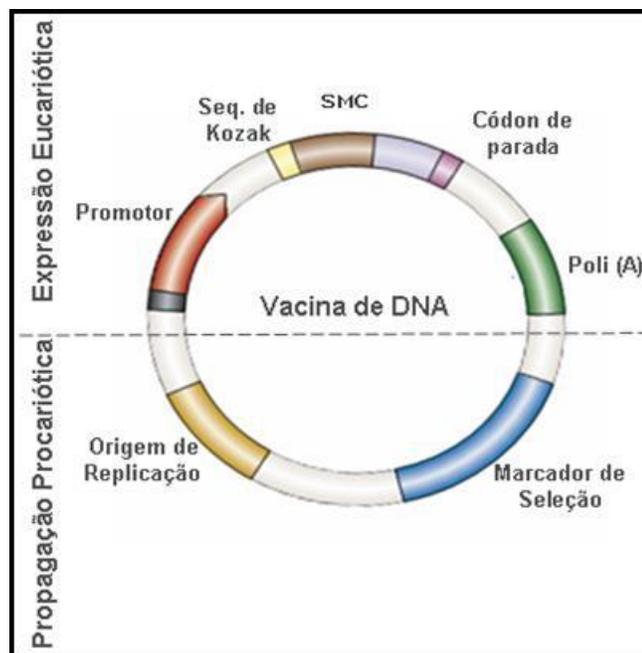


Figure 1: Representação esquemática de um plasmídeo vacinal. Na parte superior da figura, encontra-se a Região de Expressão Eucariótica, responsável pela expressão do antígeno em células eucarióticas, contendo o promotor que promove a expressão da ORF de interesse, a sequência de Kozak, códon de parada e a sequência sinal de poliadenilação (Poli-A), para estabilização do transcrito primário. Na parte inferior, encontra-se a Região de Propagação Procariótica, responsável pela propagação e manutenção do plasmídeo vacinal na célula bacteriana, contendo assim uma origem de replicação procariótica e um marcador de seleção. **Fonte:** Adaptado de Kutzler e Weiner, 2008.

Atualmente todos os plasmídeos utilizados como vetores de vacinas gênicas utilizam origens de replicação teta e a grande maioria destes plasmídeos é derivada dos plasmídeos pBR322 ou pUC, possuindo a origem de replicação ColE1, de *Escherischia coli*. ColE1 é o sistema melhor caracterizado, sendo qualificado por

permitir alta taxa de replicação do DNA plasmideano em um curto período de tempo (Williams, Carnes e Hodgson, 2009).

Em relação aos marcadores de seleção, os mais utilizados são genes que conferem resistência a antibióticos, sendo responsáveis pela estabilidade/manutenção do plasmídeo na célula bacteriana. O marcador de resistência mais comumente utilizado é a canamicina. A resistência à ampicilina não é recomendável, devido à sua hiper-reatividade, vista em alguns pacientes que fazem uso dos antibióticos β lactâmicos (Williams, Carnes e Hodgson, 2009). Por sua vez, a resistência às tetraciclinas é tóxica para alguns hospedeiros, como *E. coli*.

No cassete de expressão eucariótica, vários tipos de promotores virais têm sido utilizados, sendo que dentre eles pode-se citar o promotor do Citomegalovírus (pCMV), Rous vírus (pRSV), Símio vírus (pSV40), Baculovírus (promotor da polihedrina) e Herpes simplex vírus tipo 1 (promotor da timidina quinase). Atualmente O pCMV é o mais utilizado, por promover um alto nível de expressão constitutiva.

Além disso, a utilização de alguns promotores não-virais também vem sendo uma alternativa atraente, como o promotor da poliubiquitina C humana (UbC) e o promotor do fator de alongação 1 α (EF1 α) (Gill *et al.*, 2001). Outros promotores intensamente estudados são aqueles promotores ativos somente em células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen Presenting Cells*), otimizando, assim, a resposta imunológica (Ni *et al.*, 2009). Um exemplo destes promotores é o promotor do gene do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) de classe II (Vanniasinkam, Reddy e Ertl, 2006). Porém, é necessário que esta estratégia explore promotores que sejam ativos em várias populações de APCs e não numa única população para, desta forma, garantir uma resposta imunológica adequada (Ahsan e Gore, 2011). Promotores quiméricos também estão sendo considerados, como o promotor quimérico SV40-CMV. (Shepherd e Scott, 2008). Com a utilização deste promotor, observou-se melhora na expressão e/ou na imunogenicidade, conferida pela vacina de DNA (Kutzler e Weiner, 2008). Somando-se às estratégias acima citadas e visando uma alternativa aos promotores virais, um recente trabalho comparou dois promotores, o pCMV e o promotor macrosalin. Macrosalin é uma glicoproteína expressa especificamente em monócitos, macrófagos

e, em menor proporção, em células dendríticas (DC), ou seja, um promotor que está presente em grande parte das APCs. Esta pesquisa reportou que mesmo o promotor macrosalín tenha mostrado uma menor expressão da proteína de interesse quando comparado ao promotor viral, essa foi suficiente para induzir proteção nos animais vacinados, quando utilizada a via intramuscular (Ahsan e Gore, 2011).

A possibilidade de se codificar múltiplas proteínas em uma única construção é uma vantagem importante que as vacinas de DNA têm sobre outros tipos de vacinas (Capone *et al.*, 2006; Williams, Carnes e Hodgson, 2009). Assim, além do antígeno ao qual se deseja imunizar, podem, por exemplo, ser adicionados ORFs com funções adjuvantes, no intuito de melhorar a potência destas vacinas (Ingolotti *et al.*, 2010).

A inserção de uma sequência consenso específica, presente no mRNA eucarioto sinalizando o *start codon*, denominada sequência de Kozak (ACCATGG), é necessária para iniciação da síntese proteica em células eucarióticas. Para garantir a terminação correta da proteína, também é importante a inserção de um ou mais *stop códons* (Kutzler e Weiner, 2008).

A inclusão de um sítio de rescisão, ou sequência sinal de poliadenilação (AAUAAA) junto à extremidade 3' da sequência de interesse é essencial para uma correta expressão eucariótica. O sinal de poliadenilação é necessário para a correta finalização da transcrição do gene de interesse (clivagem do pré-mRNA de 11-30 nucleotídeos *downstream* a sequência), adição da cauda poli-A e exportação do RNA mensageiro (mRNA), do núcleo para o citoplasma, desempenhando um papel importante na estabilidade do mRNA (Kutzler e Weiner, 2008). A maioria dos vetores utilizados como vacinas de DNA contém o sinal de poliadenilação de SV40 ou do Hormônio Bovino do Crescimento (BGH, do inglês *Bovine Growth Hormone*). Estudos têm revelado que a sequência sinal de poliadenilação do BGH é até duas vezes mais eficiente que as demais, sendo, por isso, a mais comumente utilizada (Xu *et al.*, 2002).

2.1.4 Otimização da Imunogenicidade Das Vacinas Gênicas

A otimização da imunogenicidade das vacinas gênicas é tema de inúmeras pesquisas na comunidade científica. Várias estratégias tem sido desenvolvidas no intuito de se obter um modelo vacinal promissor.

Uma destas estratégias consiste na otimização dos códons (*codon usage*) para maximizar a expressão da ORF de interesse na célula hospedeira. A referida técnica promove uma alteração específica da sequência codificadora com base nos níveis de RNA transportador (tRNA) geralmente disponíveis naquela célula, podendo assim, resultar em maiores taxas de tradução da proteína em questão, conforme descrito por diversos autores (Kim e Sin, 2005; Tokuoka *et al.*, 2008; Muthumani *et al.*, 2008). Como exemplo bem sucedido desta estratégia, pode-se citar um estudo recente de vacinas gênicas desenvolvidas para o vírus do papiloma humano (HPV), onde se demonstrou aumento da imunogenicidade e indução de forte resposta imune humoral e celular em modelos animais (Zhao e Chen, 2011). A adição de sequências líder ou região 5' não-traduzida (5'-UTR) antes da ORF de interesse também podem aumentar a estabilidade do mRNA e contribuir para uma maior eficiência de tradução (Xu *et al.*, 2001).

O aumento da taxa de secreção proteica pode melhorar a produção de anticorpos (Haddad *et al.*, 1997). Para tanto, ORFs de interesse podem ser modificadas para produção de proteínas secretadas, ligadas a membrana, citosólicas ou associadas a uma organela, de forma que, alterando a localização celular, a resposta imunológica possa ser influenciada (Becker *et al.*, 2008).

Quando necessária a expressão de mais de uma ORF de interesse (como antígenos e citocinas) para geração de uma resposta imune mais robusta, há a possibilidade de se utilizar um sistema de expressão policistrônico ou ainda fazer uso de epítomos fundidos, expressos como um único polipeptídeo (Becker *et al.*, 2008). Uma vacina de DNA codificando Ag85A de *M. tuberculosis* junto ao fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) demonstrou resultados satisfatórios, quando avaliada a resposta imunológica gerada em ratos (Dou *et al.*, 2005).

Um importante componente das vacinas de DNA são as sequências imunoestimulatórias (ISS) (Pisetsky, 1996), denominadas motivos citosina-fosfato-guanina não metilados (motivos CpG). Os motivos CpG são responsáveis pela ativação do receptor Toll-like 9 (TLR, do inglês *Toll Like Receptor*) e desempenham um papel fundamental na imunidade inata e adaptativa, pela estimulação de linfócitos B, células dendríticas, macrófagos e células NK (NK, do inglês *Natural Killer*) (Li e Zhu, 2006; Kumagai *et al.*, 2008). Com base nestes motivos, a célula pode discriminar entre DNA endógeno e exógeno, sendo estas sequências praticamente ausentes em células humanas, apresentando assim propriedade adjuvante nas vacinas de DNA (Angel *et al.*, 2008).

Uma estratégia promissora que visa o melhoramento dos níveis de imunogenicidade das vacinas gênicas é a co-injeção de plasmídeos que codificam proteínas imunomoduladoras, tais como interleucinas (IL), interferons (INF), quimiocinas e moléculas co-estimulatórias. O objetivo desta estratégia é aumentar a quantidade e a potência das células apresentadoras de antígeno, sem os efeitos adversos da administração de citocinas na forma de proteínas purificadas. Testes em macacos com uma vacina de DNA contra HIV-1 mostraram que a co-administração de plasmídeos codificando IL-12 e IL-15 foi capaz de aumentar a imunidade celular e humoral (Chong *et al.*, 2007). Recentemente, trabalhos realizados com uma linhagem de BCG recombinante co-expressando as proteínas de Ag85B/CFP10 de *M. tuberculosis*, junto à citocina imunoestimulatória IL-12, demonstraram a geração de uma forte resposta imune em ratos que receberam a referida vacina, considerada qualitativamente superior à resposta induzida pela vacina BCG licenciada (Lin *et al.*, 2012).

A proteção atribuída por uma vacina tem sido associada com a permanência do antígeno no organismo. Para cumprir com esta premissa e ao invés de aumentar o número de doses, pesquisadores sugerem a necessidade de administração de doses “reforço”, a fim de sustentar a imunidade estimulada pela dose inicial. A maioria das vacinas licenciadas incluem uma dose estímulo e ao menos um reforço do mesmo imunógeno, para assim, gerar uma efetiva resposta imune no que refere a: eficiência, qualidade e localização da resposta imunológica (Fiorino *et al.*, 2013)

O princípio de “dose inicial-reforço”, denominado *prime-boost*, é bastante investigado na comunidade científica. Existem dois tipos de abordagens relacionadas às estratégias de *prime-boost*: homólogas e heterólogas. O Prime-boosted homólogo é aquele no qual a mesma formulação vacinal é administrada várias vezes ao longo de um determinado período de tempo. Por sua vez, o conceito de reforço heterólogo, consiste em um mesmo antígeno ser apresentado de forma diferente ao sistema imune durante a dose inicial e a de reforço (Rodrigues *et al.*, 2004; Lu, 2009; Radosevic *et al.*, 2009). É de fundamental importância que a formulação utilizada na dose inicial suscite uma resposta com o padrão requerido para conferir proteção ao indivíduo vacinado. Já a dose reforço terá como função apenas a expansão e manutenção da resposta imune inicial. Foi comprovado que esta estratégia aumenta a potência da vacina de DNA, particularmente na produção de anticorpos (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001). O *prime-boost* heterólogo tem sido aplicado em diferentes combinações de sistemas de entrega e foi testado em vários ensaios clínicos (Hill *et al.*, 2010; Paris *et al.*, 2010; Rowland e McShane, 2011; O’Hara *et al.*, 2012; Sheehy *et al.*, 2012). Pelo fato de o *prime-boost* heterólogo poder ser administrado numa combinação de diferentes vias de vacinação, como por exemplo, por via de mucosas e via sistêmica, possui a vantagem de induzir respostas imunes tanto em nível local quanto sistêmico, demonstrando a capacidade de produzir melhores resultados imunológicos (McCluskie *et al.*, 2002; Glynn *et al.*, 2005; Mapletoft *et al.*, 2010; Pattani *et al.*, 2012).

2.1.5 Mecanismo de Ação das Vacinas de DNA

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 esta siga um caminho complexo, que pode mimetizar a infecção natural. Acredita-se que uma vez que o DNA plasmideano é administrado, este seja internalizado pela célula e translocado para o núcleo, sendo capaz de atravessar a membrana nuclear por três maneiras distintas: (i) difusão; (ii) difusão facilitada e (iii) durante a mitose (Faurez *et al.*, 2010). Uma vez no núcleo, utilizando a maquinaria de transcrição das APCs e das células locais, a ORF de interesse é transcrita e

posteriormente traduzida em proteína. Em seguida, as proteínas recém-sintetizadas são degradadas nos proteossomas celulares, em peptídeos de 8 a 10 aminoácidos (aa), e estes são transportados ao retículo endoplasmático (RE) através de um sistema de transporte especializado que utiliza proteínas transportadoras TAP I e TAP II, em um processo dependente de ATP. Uma vez no RE, esses peptídeos são vinculados à moléculas de MHC de classe I e direcionados para a via secretória, atingindo a superfície celular. Este complexo “MHC I-peptídeo” é então reconhecido pelos receptores de células T (TCR, do inglês *T Cell Receptor*), que ativam linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) (Tang, DeVit e Johnston, 1992; Waine e McManus, 1995; Shedlock e Weiner, 2000; Huygen, 2005). Além disso, estas proteínas exógenas podem ser secretadas ativamente pelas células transfectadas, estimulando diretamente a produção de anticorpos por linfócitos B, ou estas células podem também entrar em apoptose e liberar vesículas apoptóticas. Dessa forma os antígenos são endocitados e/ou fagocitados (apresentação cruzada nas vacinas de DNA) e entram na via endossômica, onde serão degradados em peptídeos maiores (15 a 25 aa), que logo são vinculados a moléculas de MHC de classe II. O referido complexo “MHC II-peptídeo” é então translocado para a superfície celular e reconhecido por receptores das células T, ativando assim linfócitos T CD4⁺, gerando expansão da resposta imune (Tang, DeVit e Johnston, 1992; Waine e McManus, 1995; Shedlock e Weiner, 2000; Huygen, 2005). A célula hospedeira fornece as modificações pós-traducionais necessárias, às proteínas de interesse, simulando uma infecção natural, ativando linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ bem como a produção de anticorpos, sendo esta uma das maiores vantagens da imunização gênica (Liu, 2011) (Figura2).

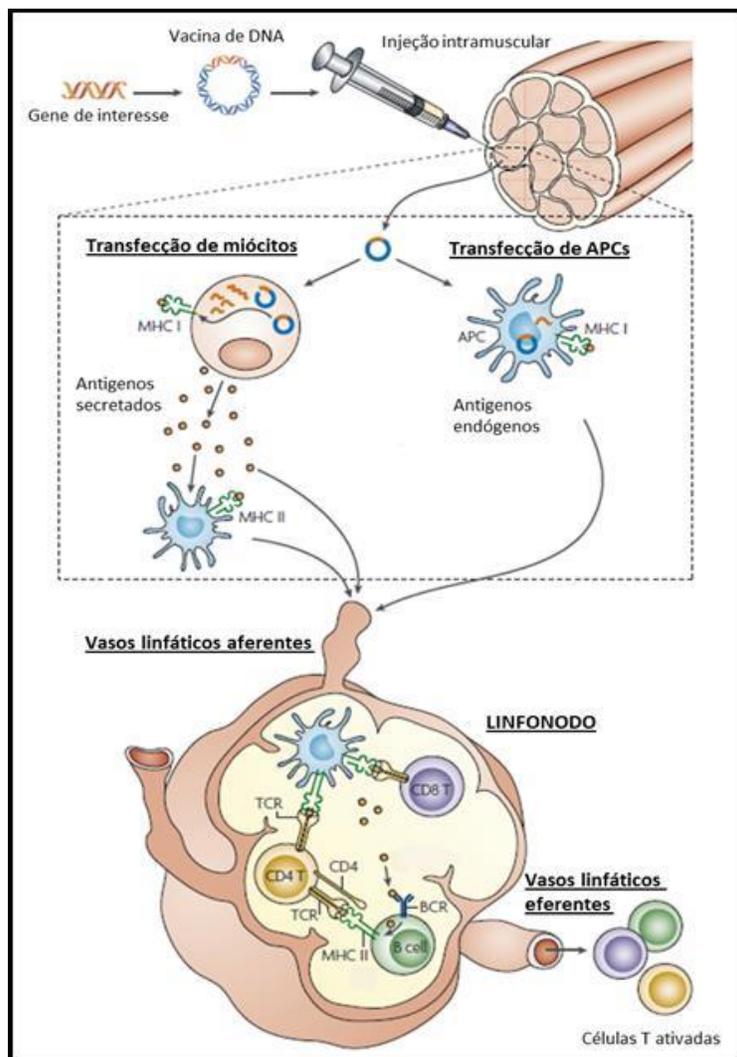


Figure 2: Representação Esquemática da Indução da Imunidade Celular e Humoral por Vacinas de DNA. A sequência codificadora de interesse é clonada no plasmídeo vacinal e este então é administrado ao indivíduo. O exemplo demonstra a entrega da vacina de DNA por via intramuscular. Após alcançar o núcleo de miócitos e APCs, os componentes do plasmídeo permitem a iniciação da transcrição gênica, levando à síntese de proteínas no citoplasma. Posteriormente, as APCs migram através dos vasos linfáticos aferentes para os órgãos linfóides e apresentam os peptídeos antigênicos via moléculas de MHC classe I ou II aos linfócitos T. Células TCD8+ tornam-se ativadas assim como os linfócitos TCD4+, que passam a secretar citocinas, levando à ativação de células B. Além disso, os antígenos livres são reconhecidos por imunoglobulinas expressas na superfície das células B, que, por sua vez, os apresentam novamente aos linfócitos TCD4+ auxiliares. Esse processo coordenado gera uma resposta específica contra o antígeno de interesse após ativação de células T e B que migram através dos vasos linfáticos eferentes para o local onde a vacina foi administrada. **Fonte:** Adaptado de Kutzler e Weiner, 2008.

2.1.6 Métodos de entrega das vacinas de DNA

Existem diversas barreiras celulares que dificultam a chegada do DNA exógeno para seu tecido alvo. Uma importante barreira que o DNA plasmideano deve superar é o meio extracelular, pois uma vez desprotegido, o mesmo pode ser exposto a nucleases, que são capazes de degradá-lo, tornando-o ineficaz para induzir uma resposta imune (Júnior *et al.*, 2004). A membrana plasmática bem como o envelope nuclear das células se mostram também como grandes obstáculos a serem transpostos pelo plasmídeo vacinal para que a vacina de DNA seja de fato efetiva (Lechardeur *et al.*, 1999). Sendo assim, diferentes métodos de entrega têm sido desenvolvidos com o intuito de superar estas dificuldades.

A biobalística ou *gene gun* é o método utilizado para aumentar a entrega epidérmica de DNA, onde as células de Langerhans e queratinócitos são diretamente transfectados pelo bombardeio de partículas de ouro revestidas com os plasmídeos de DNA (Fuller; Loudon, e Schmaljohn, 2006). Outra estratégia que tem sido bastante investigada e tem se mostrado promissora para a entrega de vacinas de DNA é a eletroporação, técnica que se baseia na aplicação de pulsos de alta voltagem com duração de milissegundos em um tecido, gerando poros na membrana celular, permitindo a entrada da vacina de DNA no citoplasma das células (Zaharoff *et al.*, 2002). O dano tecidual que a eletroporação provoca gera inflamação, que recruta células dendríticas (DC, do inglês *Dendritic Cell*), macrófagos e linfócitos para o local da injeção (Murtaugh e Foss 2002; Liu *et al.*, 2008), induzindo uma importante resposta imune celular e humoral. Em estudos envolvendo primatas, a entrega das vacinas de DNA por eletroporação tem aumentado os níveis de resposta, bem como a amplitude das mesmas (Luckay *et al.*, 2007).

Outro método estudado é a iontoforese, técnica que utiliza uma força elétrica de baixa intensidade que promove a movimentação de íons no estrato dérmico, sendo usada para otimizar a entrega intradérmica de vacinas de DNA (Prausnitz e Langer, 2008). Mais recentemente tem sido desenvolvida a técnica denominada “*DNA tattooing*” para administração de vacinas gênicas; estratégia esta que se assemelha a um processo de tatuagem e que tem apresentado resultados interessantes quanto à

geração de respostas imunes mais potentes (Pokorna, Rubio e Muller, 2008; van den Berg *et al.*, 2009). Esta técnica também tem mostrado resultados promissores tanto em modelo animal de pequeno porte como em primatas não humanos e está atualmente sob avaliação clínica (Oosterhuis *et al.*, 2012).

A nanotecnologia, assim como a utilização adenovírus (Benihoud, Yeh e Perricaudet, 1999), retrovírus (Hu e Pathak, 2000) ou Vaccinia vírus (Moorthy *et al.*, 2003), também vem sendo explorada para facilitar a internalização destas vacinas. A nanotecnologia é atualmente aplicada na administração de drogas, mas já está sendo considerada para a entrega de vacinas de DNA e terapia gênica (Peek, Middaugh e Berkland, 2008).

2.1.7 Vias de Entrega das Vacinas de DNA

As vias de entrega de uma vacina de DNA são consideradas outro parâmetro de grande importância para a expressão dos antígenos de interesse e condicionamento de uma resposta imune eficaz.

Existem diversas vias e formas pelas quais uma vacina de DNA pode ser administrada, sendo que a administração de DNA nu, por via intramuscular, tem sido a abordagem mais utilizada (Kutzler e Weiner, 2008). Entretanto, embora esse mecanismo seja um processo simples e de baixo custo, alguns inconvenientes podem limitar sua utilização, como por exemplo, a necessidade de aplicação de grandes quantidades de plasmídeo (Lowrie *et al.*, 1997). Além disso, as vacinas administradas parenteralmente são pouco eficientes em estimular o sistema imune associado a mucosas, sendo efetivas somente contra patógenos que penetram no organismo pela rota sistêmica (Lowrie *et al.*, 1997).

Este inconveniente pode ser contornado pela administração das vacinas por via das mucosas. Tem sido relatado que a vacinação utilizando a via das mucosas - oral, nasal, sublingual e do trato genital - é capaz de induzir células B de memória produtoras de IgA, como também de IgG, o que a torna excelente via na indução de uma resposta imune duradora (Quiding, *et al.*, 1991; Tengvall, *et al.*, 2010; Alam, *et al.*, 2011; Simon, *et al.*, 2011).

A vacinação por esta via, recomendada pela Organização Mundial da Saúde por razões econômicas, logísticas e de segurança, apresenta a possibilidade de geração de ambas as respostas imunes sistêmica e de mucosas (Neutra e Kozlowski, 2006; Wells, 2011), sendo esta última particularmente interessante, haja vista que patógenos como *Escherichia coli*, rotavírus, *Shigella flexneri*, dentre outros, utilizam esta via como porta de entrada para infecção das mucosas, já patógenos como HIV, *M. tuberculosis* utilizam a mucosa como uma porta de entrada para uma infecção sistêmica (Neutra e Kozlowski, 2006).

Desta forma, as vacinas de mucosas, podem contribuir significativamente para a melhoria da saúde global, estimulando respostas imunes não só contra infecções das mucosas, mas também contra doenças como HIV e *Mycobacterium tuberculosis* (Holmgren e Czerkinsky, 2005; Neutra et al., 2006). Ademais, a administração de vacinas por esta via é relativamente simples, o que permite maior aceitação por parte dos indivíduos a serem vacinados (Bahey-El-Din, Gahan e Griffin, 2010a).

Portanto, uma área atraente no desenvolvimento de vacinas de nova geração e o desenvolvimento de vacinas adequadas para imunização das mucosas (Zaman, Chandrudu e Toth; 2013), como também o uso de diferentes tipos de adjuvantes adequados para essa via.

2.1.7.1 Vias das mucosas

A maioria das infecções bacterianas e virais se dá através das superfícies das mucosas, de forma que a imunidade contra agentes infecciosos poderá depender da indução da resposta imune associada a mucosas. Para combater alguns agentes infecciosos, a administração de vacinas pela via das mucosas é o método mais apropriado para imunização, já que várias pesquisas relatam que trata-se de uma via importante capaz de induzir respostas imunes tanto sistêmicas quanto de mucosas. (Almeida e Alpar, 1996; Boyaka et al., 2003; Holmgren e Czerkinsky, 2005; Brandtzaeg, 2010).

As principais vias de mucosas que estão sendo avaliadas para fins de vacinação com DNA são as vias vaginal (Kanazawa et al., 2008), oral (Guimarães et al., 2009) e

intranasal (Dou *et al.*, 2012). Dentre essas vias a via intranasal é considerada a mais apropriada para a vacinação de mucosas (Zaman, Chandrudu e Toth; 2013). Uma das principais vantagens que a referida via apresenta é a não utilização de agulhas, o que a torna uma via muito promissora para a realização da vacinação sem a necessidade de pessoal treinado, como também a diminuição do risco de acidentes. Uma outra característica importante é que as vias aéreas superiores estão recobertas de grandes quantidades de cílios, gerando assim uma ampla superfície de absorção. Cabe salientar que após a vacinação intranasal é possível induzir tanto imunidade sistêmica quanto das mucosas (Davis, 2001; Zaman, Chandrudu e Toth; 2013), característica esta, que torna a via intranasal uma via promissora para o desenvolvimento de vacinas de nova geração. Na tabela 2 estão citadas algumas das vantagens como também desvantagens da via intranasal (Tabela 2).

Tabela 2: Vantagens e desvantagens da vacinação intranasal.

| Vantagens | Desvantagens |
|--|--|
| Desnecessária a utilização de agulhas | Depuração rápida |
| Via não invasiva (fácil acesso) | Captura ineficiente |
| Pequenas doses do antígeno | Falta de adjuvante compatível em humanos |
| Indução de imunidade sistêmica e das mucosas | |
| Imunidade local e em sítios distantes | |
| Alta vascularização | |
| A alta quantidade de cílios | |
| Imunização de grandes grupos populacionais. | |

Fonte: Adaptado de Davis, 2001.

2.1.8 Imunidade das mucosas

O sistema Imune esta constituído por dois grandes compartimentos: o sistema imune sistêmico e o sistema imune das mucosas. O sistema imune de mucosas funciona como a primeira linha de defesa contra patógenos e basicamente está composto por sítios efetores e indutores. Os sítios indutores são os responsáveis pela captura de antígenos como também de estimular as células T e B *naive*. Posteriormente estas células irão migrar para os sítios efetores; sítios estes nos quais acontece a produção da imunoglobulina A (IgA) secretora e desta forma a imunidade inata será iniciada (Tamura e Kurata, 2004).

As superfícies das mucosas são definidas como as superfícies do corpo cobertas de muco e estas incluem a superfície respiratória, do trato gastrointestinal, urogenital além das superfícies das córneas e conjuntiva. Na superfície das mucosas, as células epiteliais e as células secretoras de muco estão organizadas de modo de estabelecer uma barreira epitelial, que em conjunto com as células do sistema imune, desempenham um papel vital na defesa do hospedeiro contra as infecções por patógenos (McKenzie, Brady e Lew, 2004). As referidas superfícies estão em contato constante com o ambiente exterior, portanto são sítios vulneráveis ao ataque microbiano e basicamente desempenham um ativo papel na regulação da resposta imune, bem como em funções fisiológicas, tais como transporte de nutrientes, íons e água, manutenção da homeostase e respiração (McKenzie, Brady e Lew, 2004; Mayer e Dalpke, 2007).

Um ser humano adulto possui em torno de 400m² de área de superfície de mucosas e estima-se que 80% do total da população das células imunes estão associadas a estas superfícies. Adicionalmente, a maioria da superfície das mucosas contem tecido linfóide especializado associado (MALT, do inglês *Mucosa-Associated Lymphoid Tissues*). O NALT consiste no tecido linfóide associado ao tecido gastrointestinal, bronquial e nasal (NALT, do inglês, *Nose Associated Lymphoid Tissue*) como também conjuntiva e o tecido urogenital. Todos eles são necessários para a indução da resposta imune (Lugton, 1999).

2.1.8.1 Imunidade Associada aos Tecidos Nasais e Faríngeos (NALT)

O Tecido Linfóide Associado aos Tecidos Nasais e Faríngeos (NALT) compreende uma estrutura organizada de células que participam na indução da resposta imunológica. Dentre essas células destacam-se macrófagos alveolares, células dendríticas (DC), linfócitos T e linfócitos B, as quais são cobertas por uma camada epitelial contendo células diferenciadas intercaladas dentre elas, denominadas de células M (do inglês, *Microfold Cells*) (Li *et al.*, 1997, Davis, 2001). As células M são o portal de entrada para os antígenos ao NALT, facilitando o transporte dos patógenos através da mucosa e no tecido linfóide organizado, e conseqüentemente são a via para a indução da imunidade das mucosas (Fujimura 2000).

A proteção nesta superfície das mucosas correlaciona-se principalmente com a produção de IgA secretória, sIgA, que junto a outros mecanismos inatos de defesa, como a secreção de mucinas, defensinas, lisozimas, óxido nítrico, dentre outros, fornecem proteção adicional contra os patógenos (Whaley e Zeitlin, 2005).

A IgA das secreções externas difere da IgA da circulação sistêmica por possuir um determinante antigênico extra, chamado de componente ou peça secretora (PS). A PS facilita o transporte de IgA para a superfície epitelial através de um receptor, RIg localizado nas células epiteliais, através de um transporte ativo, por vesículas até o lúmen (Pillai *et al.*, 2012). Portanto a imunidade das mucosas é mediada principalmente por imunoglobulina A secretora, considerado este o principal isotipo de imunoglobulinas nas secreções, sendo de grande importância na imunidade local (Lycke, 2012). O fato da sIgA possuir um alto grau de glicosilação e ser dimérica a torna resistente a degradação no ambiente externo rico em proteases presentes nas superfícies mucosas (Mestecky *et al.*, 2005).

São várias as funções que a sIgA apresenta na superfície das mucosas, dentre as quais podem ser citadas a retenção dos microorganismos no muco, sendo capaz de impedir o contato do patógeno com o epitélio e o bloqueio de moléculas específicas da superfície celular de patógenos que medeiam a invasão das células epiteliais (Hutchings *et al.*, 2004), impedindo assim o ingresso dos mesmos. As IgAs localizadas subjacentes ao epitélio possuem a capacidade de direcionar novamente ao lúmen,

patógenos que atravessaram a barreira epitelial, como também mediar a destruição dos microorganismos através das células citotóxicas dependentes de anticorpos (ADCC, do inglês *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*,) (Black, Cummins e Jackson, 1996; van Egmond *et al.*, 2001). Cabe salientar que as células B produtoras de IgA surgem a partir de células B *naive* localizadas no tecido linfóide associado a mucosas, MALT. Estas células B que inicialmente eram produtoras de IgM, pela estimulação antigênica, quando na presença de TGF- β , IL10 e fator de ativação de células B (BAFF, do inglês *B cell-activating factor*), sofrem uma mudança no isotipo de imunoglobulina de IgM para IgA (Lycke, 2012).

Os antígenos solúveis, de menor tamanho, são capazes de atravessar o epitélio nasal, enquanto que os antígenos particulados penetram - ou são capturados - principalmente através das células M (Davis, 2001). Os antígenos transportados ativamente pelas células M são então capazes de atingir as células dendríticas, macrófagos e células B. Posteriormente ocorre o processamento e apresentação destes antígenos ao sistema imune (Ogasawara *et al.*, 2011). Em consequência as células T helper CD4⁺ serão ativadas e a interação entre estas células, e com as células B, promoverão a produção de IgA por linfócitos B. Assim diferentes células B irão se deslocar para os sítios efetores onde serão diferenciadas em células plasmáticas, capazes de produzir anticorpos (Johansen e Kaetzel, 2011).

2.1.8.2 Estruturas Linfóides das Vias Aéreas Superiores em Animais e Seres Humanos

A existência de agregados linfóides na parede bronquial (similar as placas de Peyer do intestino) tem sido descrito em varias espécies de animais, tais como ratos, coelhos, camundongos e porquinhos da índia. Estes agregados encontram-se localizados ao redor da principal bifurcação bronquial, sitio este atingido pelas partículas inaladas. Já em espécies como gatos, porcos e no homem existem poucos agregados organizados. Embora existam diferenças na organização de tecido linfóide bronquial entre as diferentes espécies, acredita-se que os antígenos administrados

sejam processados da mesma forma na mucosa respiratória das diferentes espécies (Bienenstock, McDermott e Clancy, 1999).

A presença de tecido linfóide nas faringes foi descrito em 1884 pelo pesquisador Welhim vom Waldeyer, que descreve um tecido em forma de anel comportando as tonsilas nasofaríngeas ou adenoides (NT), um par de tonsilas palatinas (PT), um par de tonsilas tubais (TT), e as tonsilas linguais (LT), sendo as tonsilas, aglomerados de nódulos linfáticos revestidos apenas de epitélio com importantes funções imunológicas (Perry e Whyte, 1998) (Figura 3). Sua localização na região orofaríngea permite estreito contato do sistema imune com os antígenos tanto ingeridos quanto inalados. Os antígenos que atingem as criptas das tonsilas são capturados pelas células M e células de Langerhans, comprometendo macrófagos da região. Assim, os antígenos serão apresentados e transportados na região extrafolicular, onde encontram-se as células T. Os centros tonsilares germinais suportam significativa proliferação de células B de memória (Davis, 2001, Orga *et al.*, 2001)

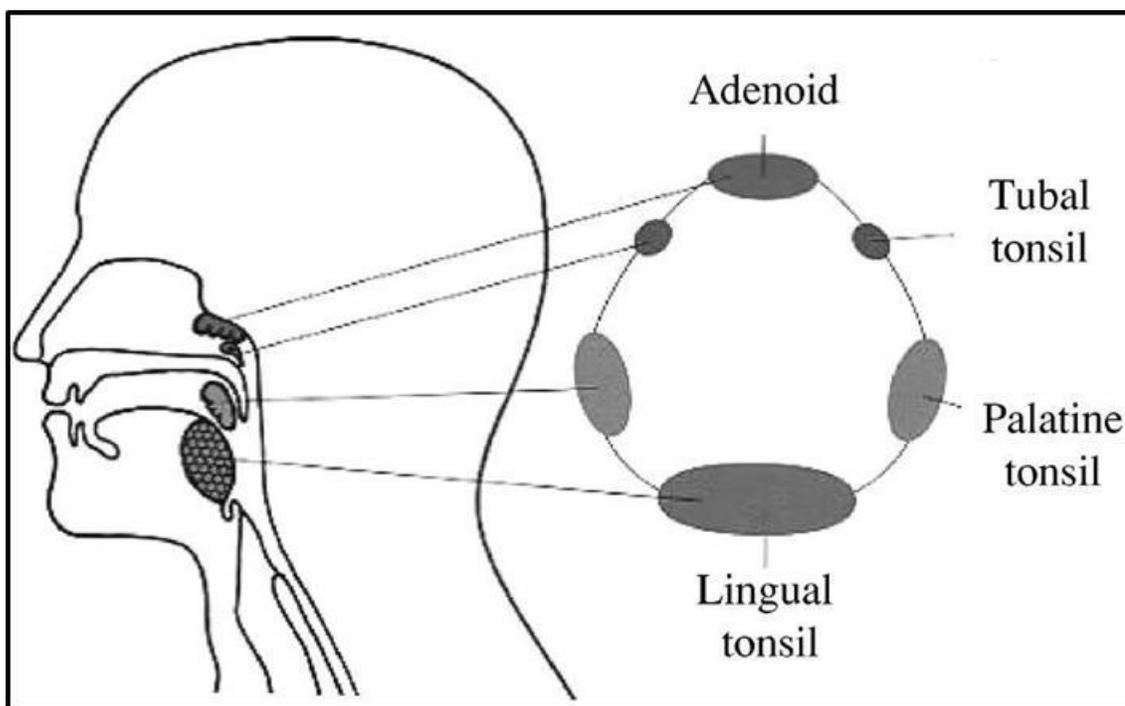


Figure 3: Tecido linfóide faríngeo e anéis de Waldeyer. Fonte: Davis, 2001.

2.1.8.3. Resposta imune associada a superfície das mucosas

Tem sido demonstrado que a vacinação intranasal além de gerar resposta imune no NALT, também tem sido eficaz na indução de imunidade sistêmica, como também das mucosas gástrica, respiratória (Brandtzaeg, 2011; Jabbal, 2010) e do trato genital, fato este que torna esta via muito promissora, inclusive no desenvolvimento de vacinas contra doenças de transmissão sexual (Mestecky *et al.*, 2011).

Uma característica comum de todos os sítios das mucosas indutivos é que incluem uma superfície epitelial comportando as células M, as que recobrem os folículos linfoides não encapsulados (FAE, do inglês *Follicle-Associated Epithelium*). Além destes componentes, também podem ser encontradas células glandulares produtoras de mucinas, linfócitos, células plasmáticas, células dendríticas e macrófagos (Orga *et al.*, 2001).

Os antígenos que ingressam ao organismo, tanto pela vias aéreas quanto pela via alimentar, são capturados pelas células M e transportados para os FAE, onde células dendríticas, apresentadoras de antígenos, irão estimular células T *naive* CD4⁺ ou CD8⁺. As células T CD4⁺ ativadas irão diferenciar em Th1, Th2, e Th17, células T regulatórias, células T helper foliculares (T_{FH}). As células T helper (CD4⁺ ativadas) receberam os antígenos estranhos processados pelas células dendríticas no contexto de moléculas MHC classe II. Desta forma as células B ativadas serão capazes de capturar antígenos, que posteriormente serão apresentados as células T proporcionando assim a ativação do sistema imune (Brandtzaeg, 2011). Células T e B migram para os linfonodos de drenantes e para os tecidos linfoides efetores como o pulmão e trato genital (Lucky, 2012). (Lycke, 2012).

Como foi mencionado anteriormente a sIgA é o principal anticorpo das superfícies das mucosas. No entanto um outro isotipo de grande relevância foi encontrado na superfície de mucosas, IgG, após a invasão de antígenos, ou administração de vacinas à superfície de mucosas (Mestecky *et al.*, 2005, Brandtzaeg, 2011). A IgG presente nas mucosas, em conjunto com a IgM pentamérica secretada, e

a sIgA, podem neutralizar patógenos, prevenindo sua entrada nas mucosas como também na circulação sistêmica (Neutra e Kozlowski, 2006).

A via T dependente conduz à produção de IgA. Tem sido considerado que esta via é essencial à construção de uma resposta imune às vacinas. A proteção contra muitas infecções bacterianas e virais baseia-se na estimulação eficaz de células T *helper* efectoras Th1. As células Th1 são linfócitos capazes de produzir interferon-gama (INF- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina 2 (IL-2), participando da defesa contra patógenos intracelulares, como também para alguns patógenos extracelulares. Por outro lado os linfócitos Th2 possuem um papel indireto, apoiando a produção de anticorpos uma vez que são capazes de produzir as citocinas: IL-10, IL-13, IL-5 e IL-4. Por sua vez, células Th17 são consideradas efectoras, definidas por sua produção de IL17, sendo estas células capazes de produzir IL-21 e IL-22 também. A população de Th17 encontra-se na lâmina própria das mucosas e participa na proteção contra várias doenças bacterianas. A população Th17 é particularmente frequente na mucosa gastrointestinal, como consequência da colonização bacteriana. As respostas influenciadas pela IL17 é essencial para a manutenção da barreira de mucosas através do recrutamento de neutrófilos, liberação de peptídeos antimicrobianos e defensinas. (Blaschitz e Raffatellu 2010; McAleer e Kolls, 2011; Mattsson *et al.*, 2011).

As pesquisas desenvolvidas em vacinas de mucosas tem mostrado que a proteção contra a infecção pode durar por um grande período de tempo, inclusive por anos, embora a IgA de mucosas não seja observada de 6 a 9 meses após a vacinação (Brandtzaeg, 2007; Czerkinsky e Holmgren, 2009). Essa duração da resposta imune é atribuída à presença das células B de memória produtoras de IgA capazes de gerar uma rápida resposta a uma segunda exposição do patógeno, com a consequente melhora na capacidade da prevenção contra a infecção (Brandtzaeg, 2007; Plotkin, 2010).

Dentro do contexto da imunização por via de mucosas, a utilização de bactérias geneticamente modificadas representa uma alternativa promissora para a entrega dos plasmídeos vacinais (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2003a).

O uso de bactérias como veículos para a vacinação genética é uma ideia atraente e simples, que deriva de um número de propriedades intrínsecas oferecidas

por este sistema. As bactérias oferecem várias vantagens em relação aos sistemas virais, uma vez que os vírus codificam proteínas virais com epítomos imunodominantes, os quais podem competir com os epítomos da proteína recombinante na indução de células T do sistema imune. Além disso, a quantidade de material genético que pode ser clonado em plasmídeos bacterianos é muito maior do que aquela que as partículas virais podem acomodar. Por fim, com relação ao perfil de segurança, as bactérias, ao contrário dos vírus, são controláveis através da administração de antibióticos comuns (Darji *et al.*, 2000).

2.1.9 Bactérias na Entrega de Vacinas de DNA

Estudos realizados por Walter Schaffner em 1980 demonstraram que as bactérias são potenciais vetores para a transferência de plasmídeos vacinais às células de mamíferos, *in vitro*. A partir desta pesquisa, várias outras foram realizadas a fim de propor as bactérias como novos vetores a serem utilizados para transferência de vacinas gênicas (Schaffner, 1980; Courvalin, Goussard e Grillot-Courvalin, 1995; Sizemore, Branstrom e Sadoff, 1995; Vassaux *et al.*, 2006). Essa transferência ocorre quando a bactéria entra na célula eucariótica em uma vesícula primária, que logo após é fundida a um compartimento lisossômico, ocorrendo a lise bacteriana. Subsequentemente, o DNA plasmideano deve escapar da vesícula para o citoplasma e, em seguida, ser translocado para o núcleo da célula, para que ocorra a expressão da ORF de interesse e conseqüentemente apresentação do antígeno ao sistema imune (Figura 4) (Schoen *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2011).

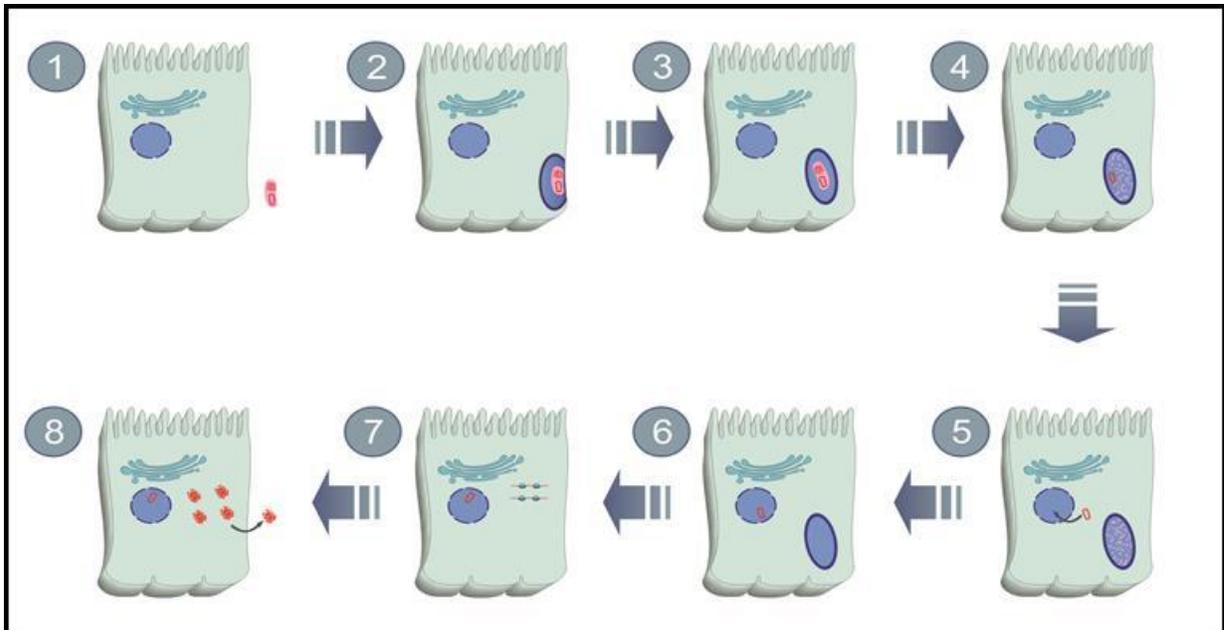


Figure 4: Representação esquemática da transferência de um plasmídeo vacinal de uma bactéria invasiva atenuada para uma célula eucariótica. (1) Célula eucariótica e bactéria contendo o plasmídeo vacinal; (2 e 3) Entrada da bactéria, em uma vesícula primária, na célula hospedeira; (4) Fusão da vesícula primária com o compartimento lisossômico e lise bacteriana; (5) Escape do plasmídeo de DNA da vesícula para o citoplasma; (6) a vacina de DNA alcança o núcleo da célula; (7 e 8) Transcrição e tradução do antígeno de interesse e apresentação deste ao sistema imune. **Fonte:** Pontes *et al.*, 2011.

Em relação à entrega de DNA nu por via intramuscular, citada anteriormente, o sistema de entrega de vacinas de DNA por bactérias é mais vantajoso, devido ao fato de que estas atravessam a membrana plasmática da célula alvo, entregando o plasmídeo vacinal diretamente no interior da mesma. O fato de as bactérias abrigarem o DNA plasmideano faz com que este plasmídeo vacinal fique protegido contra degradação por nucleases. Outra consideração a ser ressaltada é que as bactérias carreadoras são capazes de acomodar plasmídeos de grande massa molecular, o que possibilita a inserção de múltiplas ORFs de interesse (Hoebe, Janssen e Beutler, 2004). Ademais, as bactérias podem atuar como adjuvantes naturais após a invasão da célula hospedeira, devido à presença de moléculas em sua estrutura, denominadas Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), capazes de modular a resposta imune inata, e assim promover uma resposta adaptativa eficiente e duradoura. Por fim, este sistema é tido

como pouco dispendioso, devido à facilidade de cultivo das bactérias, sendo a manutenção do plasmídeo vacinal garantida pelo crescimento da cultura bacteriana e desta forma, etapas de purificação do plasmídeo tornam-se desnecessárias (Hoebe, Janssen e Beutler, 2004). Cabe ainda salientar que a maioria das bactérias transportadoras de vacinas gênicas permite a imunização de mucosas através da via oral, intranasal ou retal, além de mostrarem um tropismo natural pela indução do sistema imunológico, o que leva a uma ativação mais eficiente das respostas imunes pelo referido sistema em relação à imunização com DNA nu (Schoen *et al.*, 2004).

2.1.9.1 Bactérias Patogênicas Utilizadas Para a Entrega de Vacinas de DNA

Bactérias patogênicas intracelulares atenuadas têm sido amplamente estudadas para a entrega de vetores de expressão eucariótica às células mamíferas (Daudel, Weidinger e Spreng, 2007), dentre as quais pode-se citar, *Shigella flexneri* (Kaminski *et al.*, 2009), *Yersinia enterocolitica* (Autenrieth e Autenrieth, 2008) *E.coli* invasiva (Brun *et al.*, 2008) *Salmonella typhi* (Osorio *et al.*, 2009) e *Listeria monocytogenes* (Schoen *et al.*, 2008). Estas últimas duas bactérias têm sido recentemente estudadas como vetores de entrega de vacinas de DNA terapêuticas para tratamento do câncer, sendo esta uma estratégia interessante já que estes microorganismos são capazes de ativar diferentes componentes do sistema imune (Shahabi *et al.*, 2010).

São várias as estratégias de atenuação disponíveis, sendo que a maioria dos vetores utilizados para imunização gênica apresentam deleção de um gene essencial para o metabolismo (mutantes auxotróficos), o que limita seu crescimento *in vivo*. Outras bactérias são atenuadas de maneira a produzir uma fago lisina após sua entrada em células eucarióticas (Pilgrim *et al.*, 2003; Loessner *et al.*, 2008), o que as torna incapazes de perpetuar dentro do hospedeiro e, conseqüentemente, de causar infecções. No entanto, há sempre a insegurança de que o vetor atenuado possa readquirir a habilidade de se replicar e causar doenças no hospedeiro, fato que deve ser levado ainda mais em consideração quando se trata de sua administração em crianças bem como em pacientes imunocomprometidos (Dunham, 2002). Sendo assim, alguns grupos de pesquisa, visando estratégias mais seguras para a entrega das

vacinas de DNA, têm explorado o potencial de bactérias não patogênicas para esta finalidade, contexto no qual a utilização das Bactérias Lácticas representa uma alternativa promissora (Stahl *et al.*, 1997; Lee, 2003, Glenting e Wessels, 2005).

2.2 Bactérias Lácticas

2.2.1 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, trinta e dois gêneros bacterianos com porcentagem de G+C no genoma inferior a 55%, compõem o grupo das BL (König e Fröhlich, 2009), dentre os quais estão incluídos os gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, e *Lactobacillus*, sendo este último o maior representante do grupo, contendo cerca de 80 espécies (Carr, Chill e Maida, 2002).

Desde os tempos remotos, o ser humano utiliza essas bactérias para a fabricação e conservação de vários gêneros alimentícios, como queijos, vinhos, iogurtes, leites fermentados, picles, dentre outros. Hoje em dia sabe-se que a conservação de alimentos se deve à acidificação do meio (pH 3.5 a 4.5) e à produção de agentes bacterianos, como bacteriocinas e compostos orgânicos. Por serem utilizadas há séculos em processos de fermentação e preservação de alimentos, elas são consideradas seguras (GRAS, do inglês *Generally Recognized As Safe*) para consumo humano de acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA), órgão americano que fiscaliza medicamentos e alimentos (Van de Gauchte *et al.*, 2006).

Uma importante propriedade atribuída a muitos destes microrganismos é a manutenção da saúde e prevenção de infecções (Reid *et al.*, 2003; Klaenhammer *et al.*, 2005), referidos, assim, como probióticos, ou seja, "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro" (Sanders, 2003). Parte dos efeitos benéficos dos probióticos estão

relacionados ao fato destas bactérias serem capazes de modular a microflora intestinal, regulando o equilíbrio entre as bactérias benéficas e as potencialmente prejudiciais (Dogi *et al.*, 2012). Os probióticos são capazes de agir diretamente sobre o sistema imune do hospedeiro, aumentando tanto a resposta inespecífica (fagocitoses e atividade das células NK) (Perdigón, Fuller e Raya, 2001) quanto a resposta específica, como produção de anticorpos, citocinas e proliferação de linfócitos (Vintiñi *et al.*, 2000; Perdigón, Fuller e Raya, 2001). As propriedades imunoestimulatórias das BL foram demonstradas através do aumento da produção de IgA, da produção de citocinas, tais como INF γ , IL-12 e IL-10, além do aumento da atividade fagocítica (Perdigón *et al.*, 2002; Christensen, Frøkiaer e Pestka, 2002).

As BL, no intestino, estimulam os enterócitos a produzirem citocinas e quimiocinas, as quais podem ter efeitos sobre outras células epiteliais, sobre linfócitos intra-epiteliais e sobre outras células do sistema imune, localizadas na lâmina própria adjacente ao epitélio intestinal. Cabe ressaltar que não há um perfil de citocinas produzido pelas células imunes que caracterize uma BL como probiótica. As BL consideradas probióticas estimulam a produção de diferentes citocinas em nível intestinal permitindo ao sistema imune estar em “estado de alerta”, mas mantendo a homeostase e o balanço entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias (Galdeano *et al.*, 2007).

O potencial para novas aplicações das BL, tais como vacinas orais, produção de proteínas heterólogas e metabólitos vêm sendo explorado por vários grupos de pesquisa. Estas bactérias têm sido utilizadas como “usinas celulares” para a produção de moléculas de interesse médico e biotecnológico, como citocinas, enzimas, alérgenos e antígenos (Nouaille *et al.*, 2003; Bermúdez-Humarán, Corthier e Langella, 2004) e também utilizadas como veículo para a apresentação de antígenos exógenos às superfícies de mucosas (Mercenier, Muller-Alouf e Grangette, 2000). Recentemente, muitos dos estudos envolvendo as BL têm se concentrado em sua utilização como veículo para entrega de vacinas de DNA (Guimaraes *et al.*, 2006; Chatel *et al.*, 2008, Innocentin *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2011); utilizando principalmente a bactéria láctica modelo *Lactococcus lactis*.

2.2.2 *Lactococcus lactis*: a Bactéria Láctica Modelo

Dentre todas as BL, *Lactococcus lactis* é a espécie mais bem caracterizada e figura como microrganismo modelo no estudo das mesmas, não só por sua importância econômica, mas também devido ao fato de: (i) ser um microrganismo de fácil manipulação; (ii) possuir o status “GRAS”; (iii) ter sido a primeira BL cujo genoma foi sequenciado (Bolotin *et al.*, 2001) e (iv) possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (Dywat *et al.*, 2000; Nouaille *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2006).

Existem duas subespécies de *L. lactis*, *L. lactis* ssp. *lactis* e *L. lactis* ssp. *cremoris*, (Schleifer *et al.*, 1985). Estas 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 *Lactococcus* (Nouaille *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2006) possibilitaram o aparecimento de novas áreas de aplicação de *L. lactis*, como a entrega de proteínas, vacinas e drogas terapêuticas por via de mucosas (Braat *et al.*, 2006; Hanniffy *et al.*, 2007; Bahey-El-Din, Gahan e Griffin, 2010b).

2.2.3 Utilizações Biotecnológicas de *Lactococcus lactis*

Dentre as aplicações extra-alimentares vislumbradas para *L. lactis*, podem ser citadas: (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 produtor de proteínas diretamente no hospedeiro ou como um carreador para entrega de vacinas gênicas.

2.2.3.1 Produção de Proteínas em *Lactococcus lactis*

A expressão de proteínas heterólogas em *L. lactis* tornou-se mais acessível devido aos avanços no conhecimento genético desta bactéria como também devido ao

desenvolvimento de novas técnicas na área da 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 para *L. lactis* e outras BL (Nouaille *et al.*, 2003; Pontes *et al.*, 2011). Dentre estes sistemas, se destacam o sistema NICE (do inglês *Nisin Controlled Expression System*) (Kuipers *et al.*, 1998) e o sistema XIES (do inglês *Xylose-Inducible Expression System*) (Miyoshi *et al.*, 2004). O sistema NICE, baseado em genes que participam da biossíntese e regulação da nisina (de Ruyter *et al.*, 1996; Kuipers *et al.*, 1998), emprega o promotor PnisA e os genes regulatórios nisRK. Tal sistema é muito bem caracterizado, sendo o mais utilizado em BL (de Vos & Gasson, 1989; Wells *et al.*, 1993a; de Ruyter *et al.*, 1996; de Vos, 1999; Mierau e Kleerebezem, 2005). Por sua vez, o sistema XIES faz uso do promotor PxyIT, induzido por xilose, e dos elementos genéticos (sítio de ligação do ribossomo e sequência codificadora do peptídeo sinal) da proteína Usp45 de *L. lactis* (Miyoshi *et al.*, 2004)

O fato de *L. lactis* não produzir endotoxinas, LPS ou qualquer outro produto metabólico tóxico (Bolotin *et al.*, 2001) o torna interessante para a produção de moléculas heterólogas em relação ao uso de modelos tradicionais como *E. coli*. Além disso, este microorganismo apresenta poucas proteínas secretadas, sendo que apenas uma, a Usp45 (*Unknown secreted protein of 45 kDa*) que é secretada em quantidades suficientes para ser detectada em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE do inglês- *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) corado pela técnica “azul de Commassie” (van Asseldonk *et al.*, 1990), característica que facilita a purificação e análise das proteínas de interesse. Por fim, as linhagens utilizadas são desprovidas de plasmídeos selvagens (linhagens IL1403 e MG1363) (Gasson, 1983b; Chopin *et al.*, 1984). Aliando tais características positivas ao desenvolvimento dos vários sistemas de expressão e endereçamento protéico, inúmeras proteínas de origem eucariótica, bacteriana e viral já foram produzidas utilizando *L. lactis* como sistema de expressão (Nouaille *et al.*, 2003; Le Loir *et al.*, 2005).

2.2.3.2 Lactococcus lactis Como Vacinas Vivas de Mucosas

A microbiota do intestino humano é extraordinariamente complexa e importante para a digestão, proteção contra agentes patogênicos e principalmente para manutenção da imunidade de mucosas. As mucosas, como a gastrointestinal, são os locais onde o corpo entra em contato com a maioria dos antígenos e agentes infecciosos, representando, portanto, a primeira linha de defesa contra os microorganismos que utilizam esse meio de entrada (Kagnoff e Eckmann, 1997; Izadpanah *et al.*, 2001). A superfície da mucosa intestinal é a única dentre os tecidos que se encontra em contato permanente com uma vasta, diversa e dinâmica comunidade microbiana. A mucosa intestinal é composta por várias células diferentes, cada uma das quais contribuindo de maneira única em limitar a penetração bacteriana através da barreira epitelial e manter assim, ignorância imunológica para os simbiotes intestinais (Mcperson, *et al.*, 2001).

Recentemente, as BL, destacando-se *L. lactis*, vêm sendo utilizadas como veículo para a apresentação de antígenos exógenos na superfície de mucosas, sobretudo na mucosa intestinal. Além de possuírem o status GRAS, elas também são consideradas pouco imunogênicas, ao contrário dos microorganismos patogênicos, e podem ser continuamente utilizadas em programas de imunização, além de não possuírem LPS em sua parede celular, característica que elimina os riscos de choque por endotoxina (Mercenier, Muller-Alouf e Grangette, 2000).

O desenvolvimento dos vários sistemas de expressão, utilizando promotores constitutivos ou indutivos, de proteínas heterólogas em *L. lactis* permitiu a construção de diversas linhagens recombinantes que vêm sendo estudadas como possíveis vacinas profiláticas e terapêuticas em modelos animais (Norton *et al.*, 1995; Dieye *et al.*, 2001). Um exemplo interessante é a linhagem de *L. lactis* capaz de expressar o antígeno PAc de *Streptococcus mutans* que, após ter sido administrada em camundongos, foi capaz de suscitar nos mesmos a produção de IgG e IgA PAc-específicos (Iwaki *et al.*, 1990).

Outro grande exemplo é a linhagem de *L. lactis* que expressa TTFC (fragmento C da toxina tetânica), um antígeno altamente imunogênico. Norton e colaboradores

(1995) observaram um aumento significativo nos níveis de IgA após imunização oral de camundongos com as linhagens recombinantes produtoras de TTFC. Outros trabalhos mostraram que os animais vacinados com *L. lactis* produtora da forma intracelular deste antígeno 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).

Após o sucesso dos primeiros experimentos de imunização, *L. lactis* foi utilizada para expressar vários antígenos derivados de bactérias e vírus e as linhagens recombinantes foram testadas como veículos vacinais contra diversas doenças infecciosas (Giomarelli *et al.*, 2002; Bermúdez-Humarán, Corthier e Langella, 2004) bem como contra doenças inflamatórias do intestino (Wells e Mercenier, 2008). O primeiro ensaio clínico utilizando *L. lactis* recombinante expressando IL-10, uma citocina anti-inflamatória, foi conduzido em pacientes com a Doença de Crohn, no início de 2006. O ensaio foi aparentemente bem sucedido e demonstrou ser uma estratégia viável para o tratamento dessa doença em seres humanos (Braat *et al.*, 2006; Huijbregtse, 2011).

Todavia, apesar dos resultados interessantes que vêm sendo obtidos, um grande desafio a esta abordagem se relaciona principalmente com a expressão de genes eucarióticos em *L. lactis*. O processamento pós-traducional nesta bactéria algumas vezes não é certo, pois modificações tais como glicosilações e formação de pontes dissulfureto são limitadas devido à falta da enzima dissulfeto isomerase, o que resulta em uma quantidade muito baixa da forma ativa da proteína de interesse, como observado com a IL-12 (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2003a) e interferon omega ovino (Bermúdez-Humarán, *et al.*, 2003b).

Uma estratégia para contornar este problema seria a utilização destas bactérias não só como produtoras do antígeno de interesse, mas também como veículos de entrega de plasmídeos vacinais com cassetes de expressão eucariótica ao indivíduo, de forma que as modificações pós-traducionais da proteína de interesse fossem realizadas pelas células deste hospedeiro. Dentro deste contexto, várias pesquisas têm explorado o potencial de *L. lactis* como carreador de vacinas de DNA (Guimaraes *et al.*,

2006; Chatel *et al.*, 2008; Innocentin *et al.*, 2009; Bahey-EL-Din, Ganhan e Griffin, 2010b; Tao *et al.*, 2011).

2.2.3.3 *Lactococcus lactis* Como Carreador Para Vacinas Gênicas

Em 2006, Guimarães e colaboradores demonstraram que células epiteliais da linhagem Caco-2 co-cultivadas com linhagens de *L. Lactis* nativas, contendo um cassete de expressão eucariótica da proteína β -lactoglobulina bovina (BLG), o maior alérgeno do leite de vaca, foram capazes de expressar e secretar esta proteína (Guimarães *et al.*, 2006). Mais tarde, camundongos foram imunizados com essa mesma linhagem e a proteína BLG foi detectada na membrana epitelial do intestino delgado de 53% destes animais (Chatel *et al.*, 2008). Uma resposta imunológica BLG específica, baixa e transitória do tipo Th1 foi obtida e os camundongos tornaram-se protegidos após sensibilizações com o referido alérgeno. Entretanto, apesar de interessante, observou-se baixa taxa de transferência de DNA *in vivo*. Esse fato muito provavelmente deve-se ao *status* não patogênico de *L. lactis*, o que impede sua persistência no trato gastrointestinal, dificultando sua interação com células epiteliais do hospedeiro (Chatel *et al.*, 2008).

Assim, uma estratégia adotada para aumentar a eficiência de entrega destes vetores foi o desenvolvimento de linhagens de *L. lactis* invasivas, uma das quais a linhagem de *L. Lactis* expressando o gene da internalina A (*InIA*) de *Listeria monocytogenes* (Guimarães *et al.*, 2005). *InIA* é uma proteína de 84 kDa que fica ancorada à parede celular da bactéria, mediando sua entrada em células epiteliais mamíferas por se ligar à E-caderinas presentes nas mesmas (Gaillard *et al.*, 1991; Lebrun *et al.*, 1996). Foi demonstrado que esta linhagem foi internalizada por células humanas epiteliais *in vitro* mais eficientemente que a linhagem não invasiva. O mesmo resultado foi observado *in vivo* após sua administração oral em porcos-da-índia. Além disso, essa internalização promoveu a entrega de plasmídeos contendo a ORF da proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*), levando à produção da mesma nos animais (Guimarães *et al.*, 2005).

Estes resultados foram obtidos a partir da utilização de um plasmídeo de grande peso molecular chamado pLIG (10 kb), fruto da cointegração de dois replicons, um de *E. coli* e outro de *L. lactis* (Guimarães *et al.*, 2005). Entretanto, após diversas tentativas de se clonar ORFs codificadoras de antígenos de interesse neste plasmídeo, foi verificado que sua estrutura (grande peso molecular) tornavam os procedimentos de clonagem muito difíceis. Dessa maneira, um novo plasmídeo chamado pValac (do inglês *V*accination using *L*actic *a*cid *b*acteria), de peso molecular (3742 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 (MCS, do inglês-*M*ultiple *C*loning *S*ite), (iii) sequência 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* quanto em *L. lactis*, e (iv) um gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol, para a seleção das linhagens recombinantes (Guimarães *et al.*, 2009). Devido a seu pequeno tamanho, o pValac proporciona procedimentos de clonagem e transformação mais acessíveis (Guimarães *et al.*, 2005, Pontes *et al.*, 2011), representando, dessa maneira, uma potencial ferramenta promissora para a imunização gênica (Pontes *et al.*, 2011).

Embora atraente, a utilização experimental de *L. lactis* expressando InIA em camundongos possui uma grande limitação: InIA não interage com a E-caderina murina. Assim, a estratégia de se utilizar *L. lactis* InIA+ como um veículo para a entrega de DNA só pode ser testada 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*.

Assim, uma nova 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 à células de mamíferos (Innocentin *et al.*, 2009). A proteína FnBPA medeia a adesão de *S. aureus* ao tecido hospedeiro e sua entrada em células não fagocíticas (Sinha *et al.*, 2000), portanto, sua utilização poderia facilitar a entrega dos plasmídeos vacinais. Resultados *in vitro* revelaram que esta linhagem invasiva transformada com o plasmídeo pValac:*gfp* foi

capaz de invadir células Caco-2 de maneira comparável à observada em *L. lactis* expressando InIA e mais eficiente que a linhagem não invasiva, bem como de entregar o DNA plasmideano às células mamíferas (Innocentin *et al.*, 2009).

Deste modo *L. lactis* apresenta grande potencial como veículo carreador de vacinas de DNA e à medida que mais provas de conceito vão sendo estabelecidas, vislumbra-se, em um futuro próximo, a real utilização deste microrganismo em protocolos de imunização gênica (Pontes *et al.*, 2011).

Assim, a utilização de linhagens de *L. lactis* invasivas para a entrega de um plasmídeo de expressão eucariótica expressando um determinado antígeno de interesse, poderia representar uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacinas de DNA, mais seguras, eficazes e economicamente viáveis, visando o controle de diversas doenças infecciosas, como, por exemplo, a tuberculose.

2.3 Tuberculose

2.3.1 Generalidades

Desde a antiguidade, a Tuberculose (TB) é uma doença que aflige a humanidade. O agente causador desta doença, conhecido como *Mycobacterium tuberculosis*, foi isolado pela primeira vez em 1882, pelo médico alemão Robert Koch (1843-1910). Cento e trinta anos após esta descoberta, um terço da população mundial (aproximadamente 2 bilhões de pessoas) ainda se encontra infectada com *M. tuberculosis* em estado latente, sendo que 10% destas desenvolvem a TB ativa durante a vida (Pieters, 2008), fato que torna esta doença um dos principais problemas sociais, econômicos e de saúde pública no mundo (Lugo e Bewley, 2008).

A TB é uma doença infecto-contagiosa que está intimamente associada à pobreza, ocorrendo principalmente nos países em desenvolvimento, e que tem sido exacerbada, desde os anos 80, pela crescimento do HIV (McShane, 2005).

A bactéria *M. tuberculosis* pertence à família Mycobacteriaceae e é considerada 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 aplicada mundialmente em pesquisas pelo fato de manter plena virulência em modelos animais de TB, ao contrário de alguns isolados clínicos e por ser suscetível às drogas e ser propícia à manipulação genética. A sequência completa do genoma desta linhagem foi publicada em 1998 (Cole *et al.*, 1998), sendo este re-anotado em 2002 (Camus *et al.*, 2002).

Pacientes com TB pulmonar ativa sofrem de doença debilitante grave, apresentando sintomas tais como suores noturnos, febre, tosse e expectoração com sangue, podendo transmitir o bacilo através de gotículas durante a expectoração, tosse e até mesmo durante uma simples conversa. Após a infecção e antes da doença se instalar, o patógeno induz a formação de granulomas, que são compostos de fagócitos mononucleares, células dendríticas (DCs), células B e células T (Ulrichs e Kaufmann, 2006).

A quimioterapia padrão contra a referida doença é bem extensa, com duração de seis meses de tratamento (WHO, 2005). O longo período de tratamento exigido acaba resultando no abandono do mesmo, tendo reflexos importantes no controle da doença e na seleção de bacilos resistentes (Silva, 1999; Zhang, 2005), sendo observada a ocorrência de linhagens de *M. tuberculosis* multidrogas resistentes (MDR-TB) e extensivamente droga-resistentes (XDR-TB) (Gandhi *et al.*, 2006), situação que se vê agravada devido à co-infecção TB-HIV (Espinal *et al.*, 2001; Corbett *et al.*, 2003).

2.3.2 Patologia e Imunidade

Patologia

Atualmente a TB atinge cerca de 9 milhões de pessoas resultando na morte de 1,5 milhões de pacientes por ano (Who, 2011). Trata-se de uma doença contagiosa propagada através do ar por meio de gotículas de secreção comportando os bacilos; estes são eliminados através da tosse, espirro ou mesmo da fala de pessoas com doença ativa.

Os sítios primários de infecção na TB são os pulmões, podendo também acometer outras regiões do corpo como rins, ossos, trato geniturinário, sistema nervoso central, articulações, pele, gânglios linfáticos e trato gastrointestinal (Gurski e Baker, 2008; Vilasaró *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2009).

Os fatores que irão influenciar o desenvolvimento da infecção são as condições imunológicas e genéticas do indivíduo exposto, bem como a virulência da linhagem infectante (Dannenbergh, 1989). Após a infecção e antes da doença, os bacilos multiplicam-se nos alvéolos e um pequeno número entra na circulação sanguínea disseminando-se por todo o corpo. A propagação da infecção pela via sanguínea a diversas partes do organismo gera a TB miliar. Este tipo de TB pode atingir as meninges gerando assim, a meningite tuberculosa (Palomino *et al.*, 2007).

Imunidade

Após a infecção com as gotículas contendo o bacilo, os macrófagos alveolares e células dendríticas intersticiais fagocitam o patógeno a fim de transportá-lo para os linfonodos drenantes (Reece e Kaufmann, 2012). Uma pequena quantidade de bactérias consegue atingir o parênquima pulmonar e se replicar. Nos linfonodos drenantes, os linfócitos T são estimulados pelas células dendríticas que apresentam os antígenos de *M. tuberculosis* (Dorhoi e Kaufmann, 2009; Dorhoi, Reece e Kaufmann, 2012). Durante a recirculação, as células T ativadas interagem com fagócitos mononucleares no pulmão, onde são capazes de atrair e ativar mais monócitos e mais células T, granuloma sólido, local onde o agente patogênico será contido (Co, *et al.*, 2004; Kaufmann, 2013) (Figura 5).

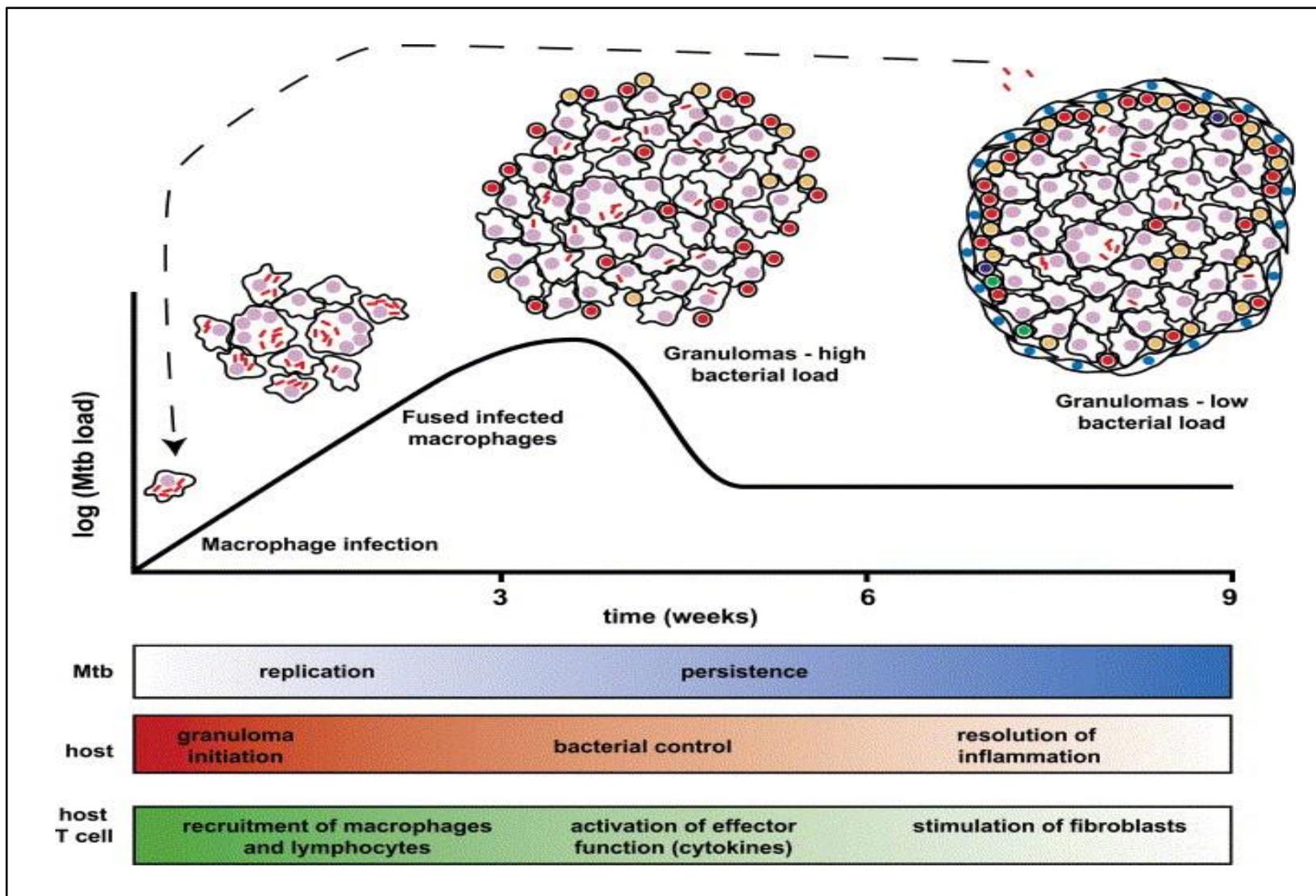


Figure 5:Fluxo da infecção por micobactérias. Na parte superior da figura, esta representado um gráfico de carga bacteriana e um esquema da formação de um granuloma. Na parte inferior do gráfico as fases da infecção por *M. tb*, resposta do hospedeiro e as diferentes funções das células T. A linha pontilhada e a seta no topo do gráfico indicam o escape da micobactérias dos granulomas, e a fagocitose por macrófagos e polimorfonucleares para a reiniciação do ciclo de formação de granulomas. Fonte: Co *et al.*, 2004.

Os polimorfonucleares infectados como também as células dendríticas após um período de tempo entram em apoptose, o que leva a formação de vesículas apoptóticas carregadas de bacilos ou antígenos do mesmo; estas vesículas serão fagocitadas por outras DC da região assim, os peptídeos serão expostos na glicoproteína MHC classe I. (Schaible, *et al.*, 2003; Winau *et al.*, 2006). Este processo conhecido como *crosspriming*, pode estimular tanto células CD4 como células CD8 que serão capazes de participar da imunidade contra o *M. tuberculosis* (Winau *et al.*, 2006; van der Wel *et al.*, 2007).

As células T CD4⁺ (helper) ativas migram para o local da infecção e, de acordo com as citocinas presentes no ambiente, serão capazes de se diferenciar em efetoras do tipo Th1, Th2 ou Th17. Assim, as DC que fagocitaram os bacilos são as responsáveis pela produção de IL12, citocina esta responsável pela ativação de células NK e diferenciação de células CD4⁺ em células efetoras do tipo Th1.

As células Th1 secretam IFN- γ , e TNF- α , responsáveis pela ativação das funções microbidas dos macrófagos e polimorfonucleares, os quais são capazes de controlar o patógeno no seu estágio intracelular (Kaufmann, 2004; Flynn, 2004; Salgame, 2005, Kaufmann 2013) (Figura 6).

Os linfócitos Th17 também participam ativamente no desenvolvimento da imunidade contra TB. Estas células produtores da citocina IL17, tem como função atrair e ativar neutrófilos para o sitio da infecção. Existe relatos de que esta citocina participa nos primeiros estádios da infecção (Khader *et al.*, 2007).

Outra população de linfócitos T que contribuem para o controle da resposta imune celular na TB são as células CD8⁺. As células T CD8⁺ produzem moléculas citolíticas como perforinas, granzimas e granzimas que, além de lisar as células do hospedeiro, são capazes de matar diretamente o bacilo (Stenger, *et al.*, 1998; Nicod, 2007). Estas células reconhecem peptídeos antigênicos no contexto de MHC classe I das células apresentadoras de antígenos (Dorhoi, Reece e Kaufmann, 2012).

Existe um grupo de células T, denominadas T reguladoras (Treg) que, ao contrario das células efetoras (CD4 e CD8), são células capazes de controlar e/ou

suprimir a resposta imune. Sua principal função baseia-se na desaceleração da resposta imune após o patógeno ter sido eliminado (Joosten *et al.*, 2008; Urdahl, Shafiani e Ernst, 2011).

As citocinas do padrão Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10, também estão presentes na resposta imunológica contra *M. tuberculosis*. Estas citocinas são capazes de estimular linfócitos B a se diferenciarem em plasmócitos com conseqüente produção de anticorpos, os que irão ajudar no controle da infecção (Mosmann e Coffman, 1989; Romagnani, 2005).

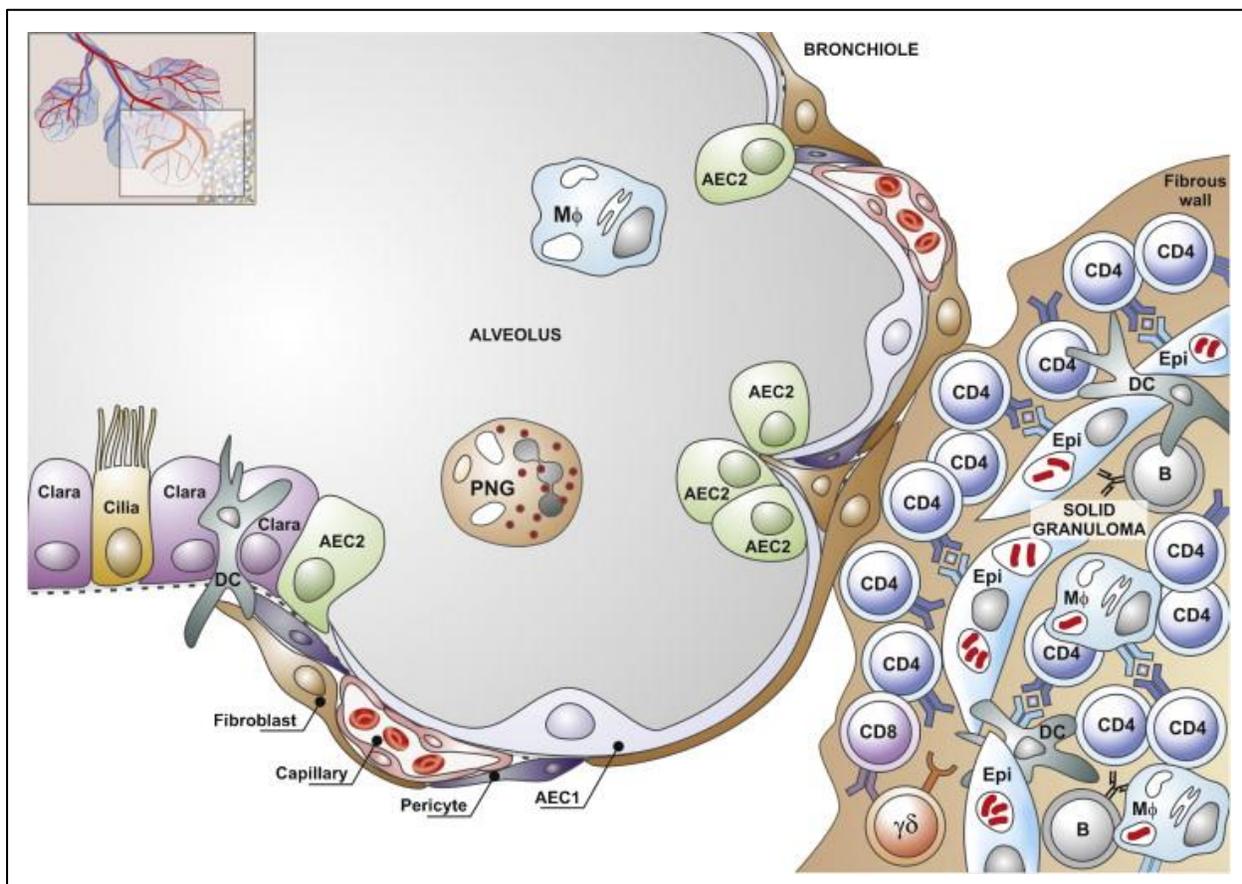


Figure 6: Representação esquemática de um alvéolo adjacente a um granuloma sólido. Os bacilos estão contidos em células epiteliais e em macrófagos dentro do granuloma. A camada exterior é constituída por diferentes subpopulações de linfócitos T cercados por uma parede fibrosa. No granuloma os linfócitos T interagem com os macrófagos e as células dendríticas. Fonte: Kaufmann, 2013.

O patógeno também é capaz de induzir a formação de granulomas, que são compostos de células fagocíticas mononucleares (MPs), células dendríticas (DCs), linfócitos B e linfócitos T (Ulrich e Kaufmann 2006). Estes granulomas podem conter o agente patológico em estado latente gerando infecção latente, ou seja, infecção sem doença clínica (Kaufmann, 2013).

2.3.2. 1 Infecção Latente e Doença Ativa.

Estima-se que 90% das pessoas infectadas com *M. tuberculosis* possuam infecções assintomáticas por tuberculose latente (TL) (Who, 2011). Somente o 5% dos casos de TL evoluem para infecção primária dentro do primeiro mês de infecção, com uma proporção significativamente alta em crianças e em pacientes imunodeprimidos, pois estes apresentam uma resposta falha na contenção do patógeno (Lawn e Zumla, 2011).

Existe um equilíbrio entre o patógeno e as células que fazem parte do granuloma. Perturbações desse equilíbrio providenciam aos bacilos vantagens sobre o hospedeiro, o que resulta em uma morte massiva de células imunes (Ulrichs e Kaufmann, 2006; Reece e Kaufmann, 2012), formando o granuloma caseoso. Desta maneira a bactéria pode multiplicar rapidamente e ser disseminada para outros órgãos pela via sanguínea e linfática e, por fim para o ambiente, seja via respiração ou expectoração, podendo infectar outros indivíduos. (Figura 7).

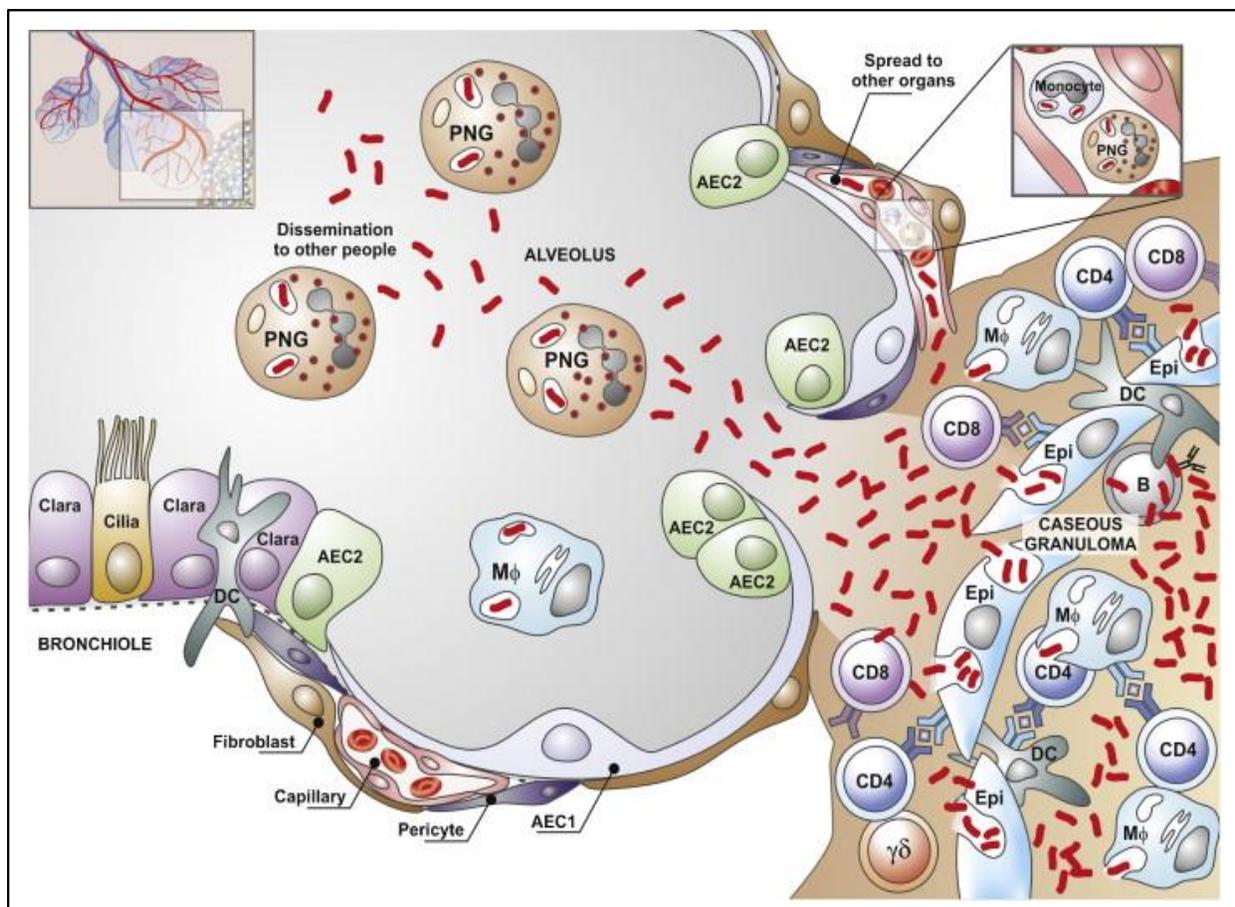


Figure 7: Representação esquemática de transmissão e difusão de *M. tuberculosis* em granuloma caseoso. Os bacilos estão contidos em células epiteliais e em macrófagos dentro do granuloma. A camada exterior é constituída por diferentes subpopulações de linfócitos T cercados por uma parede fibrosa. No granuloma os linfócitos T interagem com os macrófagos e as células dendríticas. Fonte: Kaufmann, 2013.

A manutenção de granulomas torna-se essencial para a prevenção da reativação da infecção por micobactérias em estado latente. A formação de granulomas envolve a contribuição de muitos subgrupos de células, principalmente linfócitos T, como também macrófagos. Torna-se evidente que a formação de granulomas envolve não somente a interação entre muitos tipos diferentes de células mas também das complexas interações entre hospedeiro e as micobactérias (Co *et al.*, 2004).

2.3.3. Diagnóstico, tratamento e prevenção.

O diagnóstico de TB é realizado por técnicas de coloração de Ziehl Neelsen, como também de culturas positivas de *M. Tuberculosis*, contiguamente com a avaliação de sintomas clínicos e a avaliação radiográfica do tórax do paciente. (Bock *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1995; Tattevin *et al.*, 1999).

A quimioterapia padrão contra a TB 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).

Devido ao longo período do tratamento (6 meses), a grande maioria das pessoas acaba por abandoná-lo, gerando a seleção de bacilos resistentes. Este fato, em conjunto com o surgimento de linhagens resistentes a múltiplas drogas (MDR-TB), caracterizadas por serem resistentes a isoniazida e rifampina, e de linhagens extensivamente droga-resistentes (XDR-TB), resistentes ainda à fluoroquinolona e a pelo menos um antibiótico de segunda linha (amicacina, canamicina e capreomicina), acabam dificultando ainda mais o controle da doença (Gandhi *et al.*, 2006).

A prevenção da TB torna-se importantíssima, sendo a BCG a única vacina disponível para uso clínico. A primeira vacinação utilizando BCG foi realizada em 1921, em Paris, e no Brasil os programas de imunização com esta vacina iniciaram-se em 1927 (Hijjar *et al.*, 2007). Estima-se hoje que cerca de 3 bilhões de pessoas já tenham sido vacinadas com a BCG, o que torna esta a vacina mais amplamente utilizada no mundo (Martin, 2005; Dietrich, Weldingh e Andersen, 2006).

2.3.4 Origem da BCG

Com a intenção de desenvolver uma vacina terapêutica, Robert Koch semi-purificou componentes do *M. tuberculosis*, mostrando que a injeção deste material na pele dos indivíduos gerava uma resposta imune local, a qual poderia ser revelada como inchaço e vermelhidão. Esta pesquisa deu origem ao teste tuberculínico (TST, do inglês, *Tuberculin Skin Test*), utilizando-se o derivado protéico purificado (PPD). O PPD

é um teste baseado em uma mistura de antígenos de *M. tuberculosis*, muitos dos quais são compartilhados com as proteínas da vacina *Mycobacterium bovis* BCG e de outras micobactérias ambientais não patogênicas (Harboe e Quayle, 1991; Huebner *et al.*, 1993). Hoje em dia é utilizado para fins de controle epidemiológico e profilaxia; permitindo a identificação de indivíduos que tiveram contato prévio com o agente etiológico causador da TB (Kaufmann, 2010).

Utilizando abordagens diferentes, dois cientistas franceses, Albert Calmette (1863-1933) e Camille Guerin (1872-1961), tiveram maior sucesso nas suas pesquisas ao tentar desenvolver uma vacina contra a TB, entre os anos 1906 e 1920. Seguindo a filosofia de Louis Pasteur, com o propósito de obter mutantes que tivessem sua virulência diminuída, estes pesquisadores produziram grande quantidade de cultura de *Mycobacterium bovis* (agente causador de TB em gado) e após 230 passagens, foram capazes de identificar um mutante atenuado, que não era capaz de causar doenças nos animais testados, porém conservava propriedades imunogênicas. Desta forma, em 1920 o primeiro ser humano foi vacinado contra a TB com a BCG (BCG, *Bacilo Calmette Guerin*), como foi chamada esta vacina.

A partir de 1921, várias linhagens derivaram da vacina BCG original e estas foram denominadas pelo país ou laboratório de onde foram propagadas. Mais de 50 sub-cepas de BCG são conhecidas, contudo somente seis estão atualmente em uso, sendo elas BCG Connaught, BCG Glaxo, BCG Moreau, BCG Pasteur, BCG Tokyo e BCG Danish (Minnikin *et al.*, 1984; Milstien e Gibson, 1990; Lagranderie *et al.*, 1996).

Atualmente a BCG é administrada como parte de um programa expandido de imunização, financiado pela Organização Mundial de Saúde, pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e também pela Aliança para Vacinação e Imunização (GAVI, do inglês-*Global Alliance for Vaccines and Immunisation*) (Kaufmann, 2010). Após a administração de quatro bilhões de doses, esta vacina apresenta um excelente histórico de segurança, embora este não seja completo (Kaufmann 2010; WHO, 2011). Verificou-se que a BCG é capaz de proteger crianças, com uma eficácia >80% contra as formas mais severas de TB, incluindo a meningite tuberculosa e a TB miliar (Trunz, Fine e Dye, 2006; Liu *et al.*, 2009). Em contraste, a eficácia desta 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). Apesar de controverso, tem sido estimado que o efeito da vacinação com BCG não é mais significativo, passados 10 anos da imunização, fato que leva a necessidade de doses reforço (Sterne, Rodrigues e Guedes, 1998).

Diante dos motivos expostos, faz-se necessária pesquisa e desenvolvimento de novas vacinas contra a TB, mais seguras e eficazes, 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 poderiam ter um grande impacto sobre a redução do número de novos casos de TB na população adulta mundial (Dietrich *et al.*, 2006; Kaufmann, 2010).

2.3.5 Possíveis Sucessores ou Potenciadores da BCG Como Futuros Candidatos Vacinais

Embora a geração de novas vacinas para combater a TB seja alvo de intensa investigação, nenhuma das vacinas desenvolvidas até o momento tem conseguido erradicar esta doença, considerada um importante problema de saúde global.

Existem vários grupos candidatos à vacina, que se encontram em diferentes fases clínicas. O primeiro grupo consiste de construções de BCG recombinantes, (r)BCG, que se destinam a substituir a BCG original. O segundo grupo de candidatos compreende vetores virais, os quais expressam um ou mais antígenos imunodominantes do patógeno *M. tuberculosis*. Já o terceiro grupo aborda proteínas recombinantes com adjuvantes em sua formulação. Ambos, vetores virais e formulações de proteínas com adjuvantes têm sido considerados para uma estratégia de vacinação *priming-boost*. Finalmente, um quarto grupo refere-se à administração de frações inativadas de micobactérias como também de semi-purificados das mesmas (Tabela 3) (Kaufmann, 2010).

Tabela 3: Principais candidatos vacinais em ensaios clínicos

| Tipo | Nome do Candidato | Descrição |
|-------------------------|-----------------------------|--|
| Recombinantes vivos | VPM1002 | rBCG expressando listerolisina e deleção de urease. |
| | rBCG30 | rBCG expressando o antígeno Ag85B |
| Vetores Virais | Oxford MVA86A/AERAS-485 | Vírus Ankara modificado expressando antígeno Ag85A. |
| | Crucell Ad35/AERAS 402 | Replicação deficiente do adenovírus 35 expressando os antígenos Ag85A, Ag85B e TB10.4 |
| | Ad85A | Replicação deficiente do adenovírus 5 expressando o antígeno Ag85A. |
| Proteínas Recombinantes | Hydrid-I+IC-31 | Fusão dos antígenos Ag85B e ESAT-6, em adjuvante IC-31 (IC-31, adjuvante formado pelo oligonucleotídeo e peptídeo policatiônicos (Lingnau <i>et al.</i> , 2007)). |
| | Hydrid-I+CAF01 | Fusão dos antígenos Ag85B e ESAT-6, em adjuvante CAF01 (CAF01, adjuvante formado por compostos do nitrogênio alifáticos e componentes da parede celular micobacteriana (Davidsen <i>et al.</i> , 2005)). |
| | M72 | Fusão dos antígenos RV1196 e Rv0125, em adjuvante AS01 ou AS02 (AS01, formulado na forma de lipossomos; AS02, consiste em uma emulsão óleo-água (Orme, 2006)). |
| | HyVac4/AERAS-404 | Fusão dos antígenos Ag85B e TB10.4, em adjuvante IC-3. |
| Vacinas Mortas | RUTI | Fragmentos de <i>M. tuberculosis</i> |
| | <i>Mycobacterium vaccae</i> | <i>M. vaccae</i> inativado. |

Fonte: Adaptado de Kaufmann, 2010.

A disponibilidade da sequência genômica de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) deu um impulso importante na investigação de antígenos imunogênicos e/ou imunodominantes como promissores candidatos ao desenvolvimento de vacinas mais eficazes que a BCG. Além disso, pesquisas feitas por Andersen e colaboradores reportaram que o sobrenadante da fase inicial de crescimento da cultura de *M. tuberculosis* apresentava diversos antígenos secretados com grande potencial imunogênico (Andersen *et al.*, 1991). Essas proteínas, presentes no filtrado de cultura

(CFP, do inglês *Culture Filtrate Protein*) de *M. tuberculosis*, têm sido foco de vários estudos pelo fato de serem consideradas imunodominantes, já que são capazes de produzir forte resposta imune celular e humoral (Andersen *et al.*, 1995). Dentre alguns desses antígenos, estão o ESAT-6 (Lalvani *et al.*, 1998), PstA1, ThyA, RpoB (Cho *et al.*, 2000; Bivas-Benita *et al.*, 2004) e também aqueles pertencentes ao complexo Ag85 (Wiker *et al.*, 1992).

2.3.6 O Complexo Antigênico Ag85

O complexo Antigênico 85 (Ag85) consiste de três proteínas: Ag85A (Rv3804c), Ag85B (Rv1886c) e Ag85C (Rv0129c), com peso molecular entre 30-32kDa, codificadas por três genes (*fbpA*, *fbpB*, *fbpC2*, respectivamente) que estão localizados em diferentes regiões do genoma da micobactéria (Content *et al.*, 1991). Juntas, essas proteínas constituem a maior porção das proteínas secretadas por *M. tuberculosis* e *M. bovis* (Wiker *et al.*, 1990; Wiker *et al.*, 1992) e, embora presentes em grande quantidade nos filtrados da cultura, elas também podem ser encontradas em associação com a superfície da bactéria (Schou *et al.*, 1985).

As proteínas do complexo Ag85 possuem atividade micolil-transferase, participando da síntese do ácido micólico, que constitui a parede celular bacteriana. Este ácido, por sua vez, contribui para a manutenção da integridade e patogênese destas bactérias (Belisle *et al.*, 1997; Harth *et al.*, 2002). Em adição à sua importância na biosíntese da parede celular, este complexo também pode estimular a captura da micobactéria por macrófagos humanos através da interação dessas proteínas com a fibronectina, presente na matriz extracelular. Esta interação resulta em um aumento da fagocitose do bacilo, mediada pelos receptores do complemento presentes nos macrófagos do hospedeiro (Abou-Zeid *et al.*, 1988).

Além disso, as proteínas Ag85 são fortemente imunogênicas devido à sua capacidade de estimular tanto a resposta imune celular quanto humoral. Este complexo é capaz de induzir forte proliferação de células T, produção de interferon gama (IFN- γ) e linfócitos T citotóxicos (CTL) em indivíduos infectados com *M. tuberculosis* ou *Mycobacterium leprae*, como também em ratos e humanos vacinados com a BCG

(Huygen *et al.*, 1992; Launois *et al.*, 1994; Munk *et al.*, 1994; Silver *et al.*, 1996). Desta forma as proteínas deste complexo são consideradas candidatas promissoras ao desenvolvimento de vacinas contra TB (Denis *et al.*, 1998).

As proteínas secretadas são consideradas moléculas mais acessíveis para o sistema imune. Um índice que avalia a concentração relativa dos antígenos micobacterianos localizados extra ou intracelulares é o índice de localização. Este índice relaciona a quantidade do antígeno no fluido cultural e a quantidade do mesmo antígeno no sonicado bacteriano. Assim, valores altos deste índice indicam alta eficiência de secreção, sendo o índice de localização do Ag85A o maior deste complexo estudado (Wiker *et al.*, 1990; Wiker *et al.*, 1991; Wiker *et al.*, 1992).

2.3.6.1 Ag85A como um antígeno vacinal

Em 1996, Sato e colaboradores e Huygen e colaboradores foram os primeiros a reportar a vacinação com DNA nu contra TB, através da utilização de DNA codificando a proteína de shock térmico de 65-kDa e a mycolyltransferase de 32-kDa ou antígeno 85A de *M. tuberculosis*, respectivamente (Huygen *et al.*, 1996, Sato *et al.*, 1996). A partir destes dados uma ampla variedade de antígenos contra a TB, a serem utilizados em vacinas gênicas, com diferentes graus de imunogenicidade e profilaxia, vêm sendo estudados (Huygen, 2003).

A identificação de Ag85A como um antígeno imunodominante para células T nos primeiros estágios da infecção levou a uma investigação mais detalhada do seu papel na imunidade da TB.

Pesquisas realizadas por Denis e colaboradores avaliaram a imunogenicidade de uma vacina de DNA carregando a ORF Ag85A em comparação com a imunogenicidade gerada pela infecção intravenosa com *M.tuberculosis*, em modelo murino. Estes pesquisadores observaram que a vacinação com DNA foi capaz de gerar uma forte resposta imune celular, de padrão Th1, e ativação de linfócitos citotóxicos (CTL), ao contrário do que foi observado em ratos infectados com *M. tuberculosis*, onde não foi possível observar a detecção da atividade citolítica nestes animais e nem naqueles vacinados com a BCG. Estes autores atribuem o resultado da pesquisa ao

fato das micobactérias residirem no fagossoma, o que dificulta o acesso dos antígenos protéicos ao sistema imune do hospedeiro (Denis *et al.*, 1998). Outra abordagem em que o antígeno Ag85A foi utilizado foi a vacina MVA-85A, a qual utiliza como vetor o vírus vaccínia Ankara recombinante, modificado pela adição da ORF *Ag85A*. O objetivo da construção desta vacina foi aumentar o nível de resposta de células T induzida pela BCG, através da expansão de células T Ag85 específicas (McShane *et al.*, 2004; McShane *et al.*, 2005). Várias pesquisas demonstraram que MVA-85A induziu a produção de INF- γ , com picos de produção da referida citocina entre uma e duas semanas após a vacinação (Brookes *et al.*, 2008; Sander *et al.*, 2009). Dois estudos recentes reportaram que a MVA-85A se mostrou segura e imunogênica quando administrada em indivíduos adultos com HIV e também em indivíduos que apresentavam TB e HIV (Minassian *et al.*, 2011; Scriba *et al.*, 2012). Utilizando essa vacina como reforço da primeira imunização com BCG, observou-se indução de proteção contra TB em camundongos, além de níveis significativos de células CD4+ e CD8+ antígeno-específicas em relação aos animais imunizados somente com a MVA-85A (Goonetilleke *et al.*, 2003).

Outra tentativa com o intuito de incrementar a eficácia da BCG foi o estudo do potencial de uma vacina de DNA codificando a proteína imunodominante mycoyl-transferase Ag85A, administrada seja como *priming* ou como *boosting* à BCG. O estímulo prévio com a referida vacina de DNA incrementou significativamente a eficácia protetora da BCG, indicado pela redução de caquexia e pelo prolongado tempo de sobrevivência dos animais, como também pelo significativo aumento de IL-17 e INF- γ (Romano *et al.*, 2006).

Dou e colaboradores estudaram o efeito imunogênico de uma vacina gênica codificando o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos de ratos mGM-CSF (do inglês *mouse Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) e Ag85A, em modelo murino. Estes pesquisadores concluíram que essa nova construção de vacinas gênicas foi capaz de induzir ratos a gerarem potentes respostas imunes contra o antígeno Ag85A (Dou *et al.*, 2005). Quatro anos mais tarde estes mesmos autores realizaram a estratégia *priming-boosting* utilizando a vacina BCG como estímulo, e a construção Ag85A-mGM-CSF como reforço, a fim de aumentar o efeito

imune e protetor frente ao desafio com *M. tuberculosis*. Resultados satisfatórios foram obtidos no que concerne a imunidade mediada por células como também à imunidade humoral contra o patógeno (Dou *et al.*, 2009).

Assim, todos estes trabalhos realizados com a proteína secretada Ag85A de *M. tuberculosis* apresentaram um modelo promissor de indução de imunidade contra a TB, conduzindo a extensos programas para o desenvolvimento de novas vacinas, mais eficazes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Neste contexto, e baseado nas informações anteriores, o objetivo geral deste trabalho foi utilizar uma linhagem invasiva de *L. lactis* (*L. lactis* FnBPA⁺) como veículo para a entrega, via mucosas, do plasmídeo vacinal pValac codificando o antígeno Ag85A de *M. tuberculosis* a camundongos C57BL/6 e a avaliação do perfil de resposta imunológica gerada.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Isolamento e clonagem da sequência codificadora do antígeno Ag85A de *M. tuberculosis* no vetor pValac;
- ✓ Avaliação da funcionalidade do plasmídeo pValac:Ag85A *in vitro*;
- ✓ Construção da linhagem vacinal *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A);
- ✓ Imunização intranasal de camundongos C57BL/6 com a linhagem vacinal *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A);
- ✓ Caracterização do perfil de resposta imunológica humoral por meio da detecção, no soro dos animais, dos anticorpos IgA, IgG e seu isotipo IgG1 anti Ag85A e, no lavado broncoalveolar, de IgA específicos para Ag85A.
- ✓ Caracterização do perfil de resposta imunológica celular, a partir do perfil de citocinas, padrão de resposta Th1, Th2 e Th17.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens Bacterianas, Plasmídeos, Condições de Cultivo e Estocagem

As linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 4.

Tabela 4: Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados.

| <u>Linhagem</u> | <u>Características</u> | <u>Fonte</u> |
|--|---|-----------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> TG1 | [(supE, hsd, Δ5, thi, Δlac-proAB), F'(traD36proAB-lacZΔ M15)] | Gibson 1984 |
| <i>Escherichia coli</i> TOP10 | (hsdR; mcrA; lacZΔM15; endA1; recA1) | Invitrogen |
| <i>Escherichia coli</i> (TG1) pValac:gfp | (<i>E. Coli</i> TG1 portando o plasmídeo pValac:gfp, Cm ^r) ^a | Guimarães <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Lactococcus lactis</i> (MG1363) FnBPA ⁺ | (<i>L. lactis</i> MG1363 portando o plasmídeo pOri23:fnbpA, Ery ^r) ^b expressando FnBPA de <i>S. aureus</i>) ^a | Que <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Lactococcus lactis</i> MG1363 | Linhagem selvagem | |
| <i>Lactococcus lactis</i> FnBPA ⁺ pValac:Ag85A | (<i>L. lactis</i> MG1363 portando os plasmídeos pOri23:fnbpA, Ery ^r e pValac:Ag85A, Cm ^r) | Este trabalho |
| <i>Lactococcus lactis</i> FnBPA ⁺ pValac:gfp | (<i>L. lactis</i> MG1363 portando os plasmídeos pOri23:fnbpA, Ery ^r e pValac:gfp, Cm ^r) | Este trabalho |
| <u>Plasmídeo</u> | <u>Características</u> | <u>Fonte</u> |
| Zero Blunt® TOPO® | Vetor de clonagem: (P _{lac} ; lacZα; ccdB; Km ^r ; Zeo ^r ; pUC ori;) ^a | Invitrogen |
| pUC19 | (ori ColE1/Amp ^R) ^b | Invitrogen |
| pOri23-fnbpA | (fnbpA/ori ColE1/P23/Ery ^R) ^c | Que <i>et al.</i> , 2001 |
| pValac:gfp | (pCMV/Cm ^R /RepA/RepC/ <i>gfp</i>) ^c | Guimarães <i>et al.</i> , 2009 |
| pValac:Ag85A | (pCMV/ Cm ^R / RepA/RepC/ Ag85A) ^d | Este trabalho |

^a Linhagem de *E. coli* pertencente 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).

^a : P_{lac}: promotor do operon lac; Km^r: gene que confere resistência à canamicina; pUc ori: origem de replicação; ccdB: gene letal; Zeo^R: gene de resistência a zeomicina;

^{b/c/d} pValac: Vaccination using Lactic acid bactéria; 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; Ag85A: ORF do gene codificador da proteína Ag85A de *M. tuberculosis*.

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani) (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) e quando necessário, o meio foi suplementado com 10 µg/mL do antibiótico clorafenicol (Cm) (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito; *E. coli* pValac), ou 100 µg/mL do antibiótico ampicilina (Amp) (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito; *E. coli* pUC19). As linhagens foram crescidas a 37°C, sob agitação, durante 18 horas. 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 (1:1) em solução estéril de glicerol 80% (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) e acondicionadas em ultrafreezer a -80°C.

As linhagens de *L. lactis*, por sua vez, foram cultivadas em meio M17 Glicose (M17-Gli) (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) a 30°C, sem agitação, por um período de 20 horas, e quando necessário, o meio foi suplementado tanto com 5 µg/mL de eritromicina (Ery) (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) quanto com 5 µg/mL de Cm e/ou 2,5 µg/mL de Ery. Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico foi adicionado aos meios acima citados. Para fins de estocagem, as linhagens de *L. lactis* foram cultivadas em meio líquido a 30°C por 20 horas, e em seguida, as culturas foram diluídas (1:4) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em um ultrafreezer a -80°C.

4.2 Manipulação do DNA

Todos os procedimentos de biologia molecular empregados na manipulação dos DNAs plasmideanos 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*. A qualidade do material obtido foi estimada através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1%, utilizando como referência o marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). A pureza do DNA também foi avaliada através da relação das

leituras espectrofotométricas, nos comprimentos de onda 260/280 nm. As reações de restrição enzimática, quando utilizadas, seguiram as recomendações dos fabricantes. As sequências nucleotídicas dos insertos foram confirmadas através de sequenciamento (Sanger, Nicklen e Coulson, 1977). Os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 5.

4.3 Resolução Eletroforética

Todas as amostras de DNA foram resolvidas em gel de agarose a 1% da seguinte maneira: as amostras de DNA, acrescidas de 1:5 do volume de tampão de amostra (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) foram fracionadas em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X, contendo 3,5% de brometo de etídeo (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito). As resoluções eletroforéticas foram realizadas a 100 Volts durante aproximadamente 1 hora. O DNA foi visualizado em fotodocumentador, *MultiDoc-It Digital Imaging System* (UVP) e o gel foi fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta a 320 nm. O peso molecular dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de DNA de peso molecular 1 Kb Plus DNA *Ladder* (Invitrogen).

4.4 Isolamento da ORF Ag85A

O isolamento da ORF *Ag85A* se deu por amplificação, através da técnica de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), utilizando como molde o DNA genômico de *M. tuberculosis*, linhagem H37Rv (*Genbank accession number* AL123456). Para tanto, dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados de forma complementar a sequência codificadora da ORF *Ag85A*, contendo ainda um sítio artificial de restrição em cada extremidade (*Bam*HI e *Eco*RI) e a sequência de Kozak precedendo a ORF *Ag85A* no *primer Forward* (Tabela 5).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 50 µL contendo 5 µL tampão de amplificação *Pfx* 10X (Invitrogen), 1,5 µL de dNTP 10 mM (Invitrogen), 1

μL de MgSO_4 50 mM (Invitrogen), 1 μL do *primer forward* (100 mM) e 1 μL do *primer reverse* (100 mM) (Ag85AF e Ag85AR, tabela 5), 0,5 μL do DNA total de *M. tuberculosis* (100 ng/ μL), 1 μL da enzima DNA polimerase Pfx Platinum[®] 2,5 U/ μL (Invitrogen) e 39 μL de água miliQ estéril. Essas reações ocorreram no aparelho termociclador modelo *ATC 401* (NYX TECHNIK, Inc.). As sequências dos iniciadores, dos sítios de restrição e o peso molecular do fragmento amplificado encontram-se na Tabela 5. A amplificação por PCR foi realizada sob as condições apresentadas na Tabela 6.

O volume total da reação de PCR, acima descrita, foi então depositado e resolvido em gel de agarose a 1%. Ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes ao amplicon *Ag85A* (1017 pb) foram purificados com o *kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA purificado foram estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1% assim como descrito no item 4.3. A pureza do DNA também foi avaliada através da relação das leituras espectrofotométricas, nos comprimentos de onda 260/280 nm.

Tabela 5: Sequencias dos Iniciadores utilizados nas diferentes reações de PCR realizadas neste trabalho.

| Identificação | Sequência nucleotídica | Peso molecular do fragmento |
|---|---|-----------------------------|
| Iniciador <i>forward</i> de Ag85A. Sítio de restrição para <i>Bam</i> HI sublinhado e sequência de Kozak marcada (Ag85AF) | 5' - <u>GGATCCACCATGG</u> AGCTTGTTGACAGGGTTTCG - 3' | 1017 |
| Iniciador <i>reverse</i> de Ag85A. Sítio de restrição para <i>Eco</i> RI sublinhado (Ag85AR) | 5' - <u>GAATTC</u> CCTAGGCGCCCTGGGGCGC - 3' | |
| Iniciador <i>forward</i> de FnBPA (FnBPAF) | 5' TCAGCTATTGATATCGATTA 3' | 807 |
| Iniciador <i>reverse</i> de FnBPA (FnBPAR) | 5' CAACACTATTGTGTCCACCG 3' | |
| Iniciador <i>forward</i> do vetor pValac: ValF | 5' GCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG 3' | 1174 |
| Iniciador <i>reverse</i> do vetor pValac: ValR | 5' GGCTGATCAGCGGGTTTAAACG 3' | |
| Iniciador <i>forward</i> interno da ORF Ag85A (Ag85AFi) | 5' CAGGCCAACAGGCACGTC 3' | |
| Iniciador <i>reverse</i> interno da ORF Ag85A (Ag85ARi) | 5' GACGTGCCTGTTGGCCTG 3' | |

Tabela 6: Condições das reações de PCR utilizadas para amplificar a ORF Ag85A de *M. tuberculosis*.

| Passos | Temperatura | Ciclos | Tempo |
|---------------|--------------------|---------------|--------------|
| 1 | 94°C | | 00:05:00 |
| 2 | 94°C | 29 X | 00:00:30 |
| 3 | 60°C | 29 X | 00:00:30 |
| 4 | 72°C | 29 X | 00:01:30 |
| 5 | 72°C | | 00:05:00 |
| 6 | 4°C | | Hold |

4.5 Clonagem da ORF Ag85A no Sistema Zero Blunt® TOPO®.

4.5.1 Confeção de *Escherichia coli* Eletrocompetente

Para confecção de células de *E. coli* eletrocompetentes, 100 µL de uma cultura de *E. coli* TG1 ou *E. coli* Top10 (Tabela 4) foram inoculados em 5 mL de meio LB sem antibiótico e este inóculo foi incubado à 37°C, durante 18 horas, sob agitação. Decorrido esse tempo, uma alíquota de 3 mL desta cultura foi inoculada em 300 mL de LB e incubada a 37°C sob agitação até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0,2 e 0,3.

Uma vez alcançado o crescimento desejado, a cultura foi resfriada, em gelo, por 30 minutos, redistribuída em seis tubos tipo *falcon*, contendo 50 mL de cultura em cada tubo, e estes foram centrifugados a 2019 g durante 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e se seguiu a lavagem e ressuspensão do sedimento celular adicionando a cada tubo 40 mL de uma solução estéril e gelada de glicerol 10% (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito). Este processo de centrifugação e lavagem foi repetido por mais três vezes. 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 -70°C.

Para análise da eficiência de transformação, a uma alíquota de células eletrocompetentes, descongelada em gelo durante 5 minutos, foram adicionados até 100 ng do plasmídeo pUC19 (Amp^r , Tabela 4) e a mistura de células eletrocompetentes e DNA foi transferida para cubetas de eletroporação (0,2 cm; BIO-RAD), previamente resfriadas. As amostras foram submetidas a um pulso de 2.500V, capacitância de 25

μF e resistência de 200Ω , utilizando-se o eletroporador *GenePulser XCell™* Electroporation System Quick Guide (BIO-RAD). Imediatamente após o pulso, adicionou-se as células 1 mL de meio LB a 37°C e estas foram incubadas a 37°C , sem agitação, por duas horas. Transcorrido esse tempo, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}), sendo as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} semeadas em placas contendo meio LB ágar suplementado com ampicilina ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas a 37°C durante 18 horas. A eficiência de transfecção das células electrocompetentes foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\text{Numero de colônias} \times \text{Fator de diluição} \times 10 = \text{UFC/ ml}$$

4.5.2 Transformação de *Escherichia coli* Top10 com pTP:Ag85A

O amplicon purificado, correspondente a ORF *Ag85A*, foi submetido a uma reação de ligação ao vetor Zero Blunt® TOPO® (Invitrogen; Figura 8) com o intuito de se obter o plasmídeo intermediário pTP:Ag85A. A ligação foi realizada conforme instruções do fabricante. Para tanto, foram utilizados 1 μL do vetor Zero Blunt® TOPO®, 1 μL de solução salina (diluída 1:4 em água estéril) e 4 μL do produto de PCR ($200 \text{ ng}/\mu\text{L}$), totalizando um volume de 6 μL . A reação foi mantida a temperatura ambiente durante uma hora. Transcorrido este tempo, o produto de ligação (pCR®-Blunt-TOPO® e inserto *Ag85A*) foi utilizado para transformar células electrocompetentes de *E. coli* Top10, preparadas de acordo com o protocolo descrito no item 5.5.1, com eficiência de 1×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por micrograma de DNA.

O volume total do produto de ligação foi misturado com 100 μL de células electrocompetentes da linhagem *E. coli* Top10 (Invitrogen) e esta mistura foi incubada em gelo por 10 minutos, sendo a transformação conduzida por eletroporação, seguindo-se os mesmos parâmetros descritos no item 5.5.1. Para controle negativo, 100 μL de células electrocompetentes foram eletroporadas sem adição de DNA.

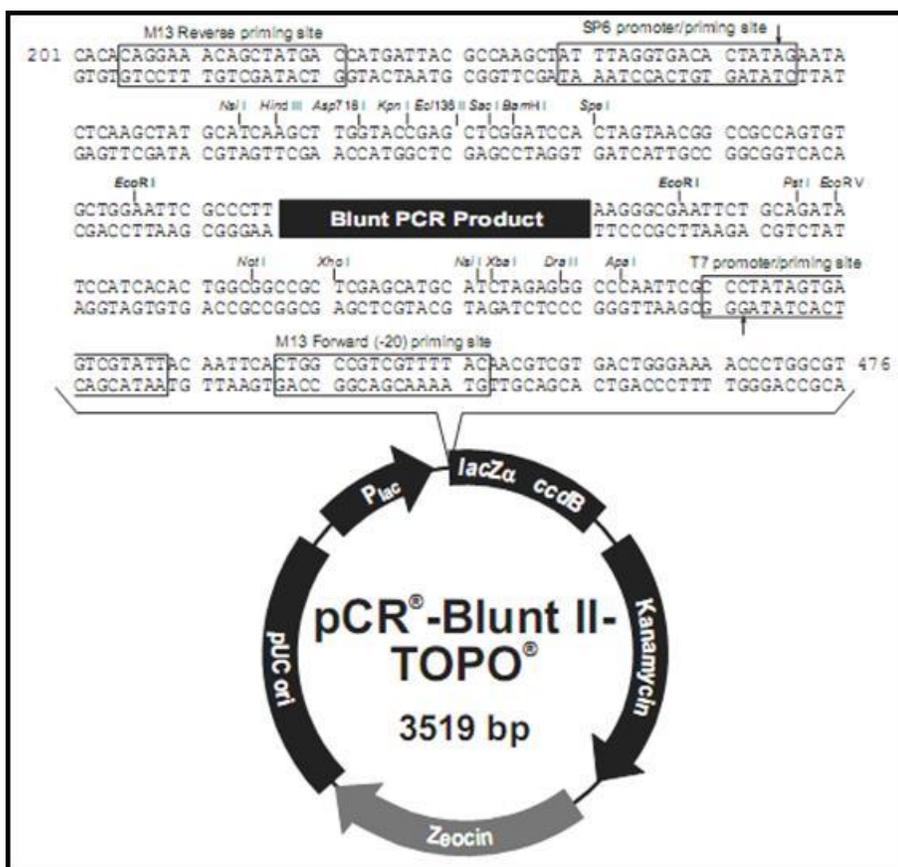


Figure 8: Representação esquemática do vetor Zero Blunt® TOPO®. Se destaca o sítio de clonagem múltipla. Os sítios das respectivas endonucleases de restrição estão indicados no local da clivagem. **Fonte:** Manual do usuário da Invitrogen.

O processo de seleção dos transformantes consistiu em semear alíquotas de 100 µL, 200 µL e o restante (700 µL centrifugados), da suspensão de células eletroporadas, em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 50 µg/mL de canamicina (Km) (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito). As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes ao referido antibiótico.

A etapa seguinte consistiu na seleção de clones de cada uma das placas para proceder com a extração plasmideana e com a confirmação da clonagem da ORF Ag85A no vetor Zero Blunt® TOPO®.

4.5.3 Extração do DNA plasmideano pTP:Ag85A de *Escherichia coli* Top10

A extração do plasmídeo pTP:Ag85A foi realizada a partir de colônias de *E. coli* Top 10 pTP:Ag85A inoculadas em 5 mL de meio LB, suplementado com 50 µL/mL de canamicina (Km).

Os inóculos foram incubados a 37°C, sob agitação, durante 18 horas. Após esse período, procedeu-se à extração plasmideana em pequena escala (*miniprep*), pelo método de lise alcalina, descrito por Sambrook e colaboradores (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989), com as modificações que se seguem: 4 mL de cada inóculo foram centrifugados por 7 minutos a 13.793 g e os precipitados celulares, ressuspensos em 200 µL de Solução I (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito), acrescidos de 1 µL de RNase A (100 µg/mL). Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, 400 µL de Solução II (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) foram acrescentados à mistura anterior e esta foi homogeneizada gentilmente por inversão dos tubos. Em seguida, 100 µL de clorofórmio foram adicionados e, por fim, 300 µL de Solução III (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito). A mistura foi homogeneizada em *vortex* e centrifugada a 13.793 g por 15 minutos. O sobrenadante, aproximadamente 500 µL, foi coletado em novos tubos onde foi realizada a precipitação do DNA plasmideano com 2,5 volumes de etanol absoluto, 10% de acetato de sódio (3 M) e 1% de glicogênio (20 mg/mL). (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) Os tubos foram então incubados por aproximadamente 2 horas a -20°C e após esse período, foram centrifugados por 15 minutos a 13.793 g e o sobrenadante foi descartado. Após lavagem com 1 mL de etanol 70% (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito), o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 25 µL de água ultrapura estéril. A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese seguindo os mesmos parâmetros já descritos no item 4.3. A pureza do DNA também foi avaliada através da relação das leituras espectrofotométricas, nos comprimentos de onda 260/280 nm.

4.5.4 Confirmação da Presença e do Peso Molecular do Inseto Ag85A no Plasmídeo Zero Blunt® TOPO®

Uma vez realizada a extração plasmideana, procedeu-se a verificação da presença do inseto e do peso molecular do fragmento de DNA clonado no vetor Zero Blunt® TOPO®. O inseto foi amplificado por PCR, utilizando-se iniciadores (Ag85AF e Ag85AR) descritos na tabela 5. 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 MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 0,5 µL do *primer forward* (100mM) e 0,5 µL do *primer reverse* (100mM), ambos a 100 pmol/µL, 0,5 µL de DNA proveniente da *miniprep* (100 ng/µL), 0,5 µL da enzima Taq DNA Polymerase Recombinant 5 U/µL (Invitrogen) e 19,65 µL de água miliQ estéril. A amplificação por PCR foi realizada sob as condições descritas na Tabela 6, em um aparelho termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.). Depois de finalizada a PCR, a presença dos amplicons foi verificada através de eletroforese seguindo os mesmos parâmetros já descritos no item 4.3.

Além da confirmação, por PCR, da presença do inseto Ag85A no vetor Topo, buscou-se também verificá-la através de digestão enzimática. Os plasmídeos extraídos conforme item 4.5.3, foram digeridos com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. A reação de digestão foi realizada em um volume total de 20 µL, sendo 10 µL de DNA (*miniprep*, 100 ng/µL), 2 µL de tampão REact3 (BioLabs), 1 µL da enzima *Bam*HI (BioLabs), 1 µL da enzima *Eco*RI (BioLabs), 0,2 µL BSA e 5,8 µL de água Milli-Q estéril. A reação foi mantida à 37°C por 18 horas e após este período, 5 µL da mesma foram depositados e resolvidos em gel de agarose à 1%, sob as mesmas condições descritas no item 4.3.

4.6 Subclonagem da ORF Ag85a no Plasmídeo pValac

4.6.1 Extração do Plasmídeo pValac:gfp

Uma alíquota de 4 mL de uma cultura de *E. coli* pValac:gfp foi transferida para tubos de microcentrifuga e procedeu-se a extração plasmideana com o kit *Wizard® Plus*

SV Minipreps DNA Purification System (Promega), conforme recomendações do fabricante ou pelo método de lise alcalina (*miniprep*) descrito por Sambrook e colaboradores (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989), conforme item 4.5.3. A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese, seguindo-se os mesmos parâmetros já descritos no item 4.3.

4.6.2 Digestão Enzimática do Plasmídeo pValac:gfp

Para a subclonagem da ORF *Ag85A* no plasmídeo pValac:gfp (Figura 9), os plasmídeos extraídos (item 5.6.1) foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI em duas etapas. A primeira reação de digestão enzimática foi realizada apenas com a enzima *Eco*RI para a verificação da linearização do plasmídeo, consistindo em 1,7 µg do plasmídeo pValac:gfp, 2 µL do tampão REact[®]3 10X (Invitrogen) e 1 µL de *Eco*RI (10 U/µL), o que totalizou um volume final de 20 µL de reação. Esta foi mantida à 37°C durante 6 horas. Para verificar a qualidade da digestão, 1 µL desta reação foi depositado e resolvido em gel de agarose à 1%, conforme item 4.3. Após a visualização da linearização do plasmídeo pValac, 1µL da enzima *Bam*HI (10 U/µL) foi adicionado à mesma reação para assim obter a liberação da ORF *gfp*. A reação foi mantida a 37°C por mais 6 horas. Novamente, para verificar a qualidade da digestão, 2 µL da reação foram depositados e resolvidos em gel de agarose a 1%, conforme item 4.3.

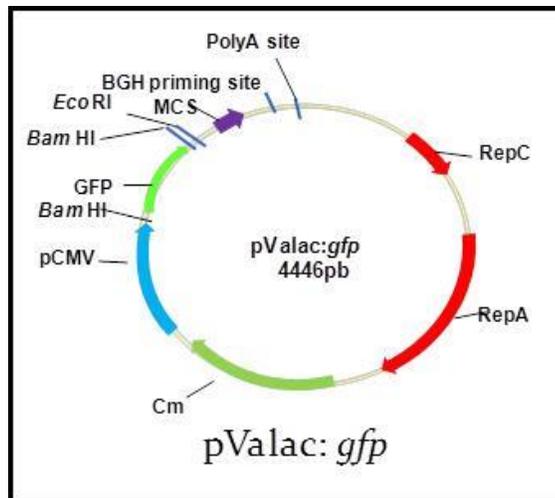


Figure 9: Representação esquemática do vetor de expressão eucariótica pValac:gfp. pCMV: promotor do citomegalovírus; MCS: sítio de clonagem múltipla; BGH priming site e T7 priming site: primer para amplificação e/ou sequenciamento do inserto; polyA site: sequência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento; RepA e RepC: origens de replicação procariótica; Cm: gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol. *GFP*: sequência codificadora da proteína verde fluorescente; *EcoRI* e *BamHI*: sítios de enzimas de restrição utilizados.

4.6.3 Purificação do fragmento referente ao vetor pValac digerido

O volume total da reação de digestão descrita no item 5.6.2 foi depositado e resolvido em gel de agarose a 1% e, ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes ao vetor pValac (3.750 pb), desprovidos da sequência codificadora da proteína verde fluorescente (*gfp*, 696 pb), foram purificados com o *Kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza dos produtos purificados foram estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1% e também em espectrofotômetro, assim como descrito no item 4.3.

4.6.4 Digestão Enzimática do Plasmídeo pTP:Ag85A e Purificação do Fragmento de DNA Referente à ORF Ag85A

Para clonagem da ORF *Ag85A* no vetor pValac, o plasmídeo pTP:Ag85A foi extraído a partir de um dos clones positivos de *E. coli* Top10 (itens 5.5.2 e 5.5.3). Em seguida, foi realizada uma reação de digestão enzimática, que consistiu em 40 µL de

DNA plasmideano (pTP:Ag85A) (350 ng/μL), 5 μL de tampão REact[®]3 10X (Invitrogen), 1 μL de *Bam*HI (10 U/μL); 1 μL de *Eco*RI (10 U/μL) e 3 μL de água milli-Q estéril. A reação foi mantida a 37°C por 6 horas, e após este período, o volume total da reação de digestão foi depositado e resolvido em gel de agarose a 1%. Ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes a ORF *Ag85A* (aproximadamente 1017pb), provida das extremidades coesivas *Bam*HI e *Eco*RI, foram então purificados com o *Kit illustra[™] GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza do produto foram estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1% como descrito no item 4.3. A pureza do DNA foi avaliada também através da relação das leituras espectrofotométricas, nos comprimentos de onda 260/280 nm.

4.6.5 Ligação da ORF *Ag85A* no Vetor pValac

Os produtos digeridos e purificados correspondentes ao inserto *Ag85A* (item 4.6.4) e ao vetor pValac (item 4.6.3) foram submetidos a uma reação de ligação, que conteve 1 μL de DNA *Ag85A* purificado (50 ng/μL) e 3,33 μL de pValac purificado (15 ng/μL), resultando em uma proporção equimolar (3:1) de inserto/vetor; 4 μL de tampão Ligase 5X (Promega); 1μL da enzima T4 DNA ligase 3U/μL (Promega) e 10,67 μL de água ultrapura estéril, totalizando um volume de 20 μL. A reação foi mantida a 4°C durante 18 horas. Após este período, a ligação foi dialisada utilizando-se um filtro de 0,025 μm (Millipore), sob água ultra pura, durante 30 minutos.

4.6.6 Transformação de *Escherichia coli* TG1 com o plasmídeo pValac:Ag85A

O produto de ligação entre o vetor pValac e o inserto *Ag85A* foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TG1, preparadas de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.1.

A transformação foi conduzida por eletroporação, seguindo-se os mesmos parâmetros descritos no item 4.5.1. Para tanto, uma alíquota (10 μL) do produto de

ligação, dialisada, foi misturada a 100 µL de células eletrocompetentes e a mistura foi incubada no gelo por 10 minutos. A eletroporação foi realizada no aparelho *GenePulser XCell™* (BIO-RAD), seguindo-se os mesmos parâmetros descritos no item 4.5.1. Para o controle negativo, 100 µL de células eletrocompetentes foram eletroporadas sem adição de DNA.

O processo de seleção dos transformantes consistiu em semear alíquotas de 100 µL, 200 µL e o restante, cerca de 700 µL centrifugados, da suspensão de células eletroporadas em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 10 µg/mL de clorafenicol (Cm). As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes ao referido antibiótico. A etapa seguinte consistiu na seleção de clones de cada uma das placas para proceder com a estocagem dos mesmos, com a extração plasmideana e com a confirmação da clonagem do inserto *Ag85A* no vetor *pValac*.

4.6.7 Confirmação da Presença e Peso Molecular do Inserto *Ag85A* no Vetor *pValac*

Cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo Cm na concentração de 10 µg/mL e os inóculos foram mantidos a 37°C sob agitação, por cerca de 18 horas. Uma alíquota (1 mL) de cada cultura foi estocada em freezer a -80°C, utilizando-se glicerol 80% na proporção de 1:1. O restante da cultura foi transferido para microtubos e procedeu-se com a extração plasmideana pelo método de lise alcalina, conforme item 4.5.3.

Para verificar a presença do inserto *Ag85A* e o peso molecular do mesmo, clonado no vetor *pValac*, o inserto do DNA plasmideano foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores *Ag85AR* e *Ag85AF*, descritos na tabela 5, e os plasmídeos foram também digeridos com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Eco*RI.

As reações de PCR foram realizadas com a enzima *AccuPrime™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) em um volume de 25 µL, contendo 2,5 µL 10X *Accuprime™* PCR Buffer, 0,5 µL do *primer forward* e 0,5 µL do *primer reverse*, ambos a 5 pmol/µL, 0,5 µL de DNA da *miniprep* (100 ng/µL), 0,5 µL da enzima *Accuprime™ Taq DNA*

Polymerase 5 U/μL e 20,5 μL de água milli-Q estéril. A amplificação foi realizada de acordo com as especificações da Tabela 6. Ao final, 2 μL destas reações foram depositados e resolvidos em gel de agarose à 1% sob as mesmas condições descritas no item 4.3.

A reação de digestão enzimática foi realizada em um volume de 10 μL, que consistiu em 5μL do DNA (*miniprep* a 100 ng/μL), 1 μL de tampão REact®3 10X (Invitrogen), 1 μL da enzima *Bam*HI (Invitrogen), 1 μL da enzima *Eco*RI (Invitrogen) e 2 μL de água ultrapura estéril. A reação foi mantida à 37°C por 4 horas e após esse período, 2 μL da mesma foram depositados e resolvidos em gel de agarose a 1% sob as mesmas condições descritas no item 4.3.

4.6.8 Reação de Sequenciamento e Análises *in Silico*

A sequência nucleotídica correspondente ao inserto *Ag85A*, clonada no vetor pValac, foi confirmada através de sequenciamento (Sanger, Nicklen e Coulson, 1977), utilizando-se os *primers forward* e *reverse* (ValF, ValR, tabela 5) do vetor pValac, como também os *primers* internos da ORF *Ag85A*, *forward* e *reverse* (Ag85AFi, Ag85ARi, tabela 5). Para isto, foi escolhido o clone pValac:*Ag85A* cuja presença do inserto foi confirmada por reações de PCR e digestão enzimática, conforme o item 5.6.7, sendo realizadas quatro repetições da reação de sequenciamento com o *primer forward* e quatro repetições com o *primer reverse*. Cada amostra foi amplificada, utilizando-se o kit *DYEnamic™ ET Dye Terminator* (GE Healthcare), como se segue: 4,0 μL do *mix “ET dye terminator”*, 1 μL do *primer* ValF ou ValR (ou utilizando *primers* Ag85AFi, Ag85Ari, tabela 5) (10 pmol/μL) e 5 μL de DNA plasmideano (50 ng/μL) (*miniprep* item 4.6.7 e 4.5.3). A reação ocorreu em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguida por 30 ciclos de de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento do *primer* à 60°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto e 20 segundos. Cabe salientar que foi utilizada a mesma temperatura de anelamento para ambos os pares de *primers* utilizados.

Logo após, os produtos da reação foram precipitados e lavados, com o objetivo de remover os nucleotídeos marcados não incorporados ao DNA amplificado. Para isto,

a cada amostra foi adicionado 1 µL acetato de amônio 7,5 M (fornecido pelo *kit*) e 30 µL de etanol 96% (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito). A mistura foi homogeneizada e incubada por 20 minutos, à temperatura ambiente, protegida da luz. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 2019 g durante 45 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de etanol 70% às amostras e as mesmas foram centrifugadas novamente a 2019 g durante 10 minutos, e o sobrenadante novamente descartado. Por fim, as amostras, precipitadas e secas, foram ressuspensas em 10 µL de “*loading buffer*” e armazenadas a 4°C até o momento de sua aplicação no sequenciador MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare).

As sequências foram comparadas utilizando-se o programa CAP3 *Sequence Assembly Program* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>), onde foi obtido um *contig* único da sequência de cada clone, eliminando-se assim prováveis erros do sequenciamento. O *contig* final foi então analisado utilizando-se o algoritmo BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para a comparação entre sequências de ácidos nucleicos utilizou-se o programa “BLASTn” e para a comparação entre a sequência de aminoácidos correspondente utilizou-se o programa o “BLASTx”.

4.7 Verificação da Funcionalidade do Plasmídeo pValac:Ag85A em Cultura de Células Mamíferas

4.7.1 Cultura de Células CHO (Chinese Hamster Ovary)

Células da linhagem Flp-In™-CHO zeocina resistentes (Invitrogen), armazenadas a -196°C em nitrogênio líquido e contendo meio completo com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito), foram descongeladas e colocadas em tubo tipo *falcon* com 3 mL do meio de cultura F12 Ham suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de L-glutamina, zeocina (100 ng/mL) e 2,5% do agente tamponante HEPES ou bicarbonato

de sódio (NaHCO_3 - Sigma) (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) (meio referido a seguir como “F12 completo”). Posteriormente as células foram centrifugadas a 81 g, durante 5 minutos, a 25°C e o sobrenadante foi descartado. Essa etapa de “lavagem” é necessária para eliminação do DMSO, substância tóxica para as células. Em seguida, foram acrescentados 10 mL de meio F12 completo (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) ao sedimento celular e essa mistura foi transferida para uma garrafa de 75 cm². Por fim, as células foram incubadas em estufa a 37°C (*Thermo Electron Corporation*) contendo 5% de CO₂, até formação de uma monocamada (tempo estimado de 48 horas).

A fim de avaliar a monocamada celular, as células foram visualizadas em microscópio invertido (*Nikon Diaphot*). Após formação da referida monocamada celular, o meio foi retirado e as células foram repicadas. Para tanto, a garrafa foi brevemente lavada com 2 mL de tripsina, sendo este conteúdo subseqüentemente descartado e adicionado mais 1,5 mL de tripsina às células. A garrafa foi deixada em repouso por 3 minutos a 37°C, período após o qual lhe foram aplicadas batidas vigorosas para que as células desaderissem. As células desaderidas foram descartadas ou utilizadas para montagem de uma nova garrafa ou de placas. No dia posterior à tripsinização, o meio de cultura foi trocado para eliminação de células mortas e/ou não aderidas. Todas as manipulações foram realizadas em capela exclusiva para cultivo celular.

4.7.2 Transfecção de Células CHO com o Plasmídeo pValac:Ag85A

4.7.2.1 Obtenção do DNA para Transfecção

Os DNAs plasmideanos (pValac:Ag85A e pValac:gfp) utilizados para transfecção das células CHO foram obtidos a partir da linhagem *E. coli* pValac:Ag85A e *E. coli* pValac:gfp, respectivamente, utilizando-se o *Kit Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System* (Promega), conforme recomendações do fabricante. Após a extração plasmideana, a concentração e pureza do DNA obtido foram estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1%, conforme item 5.3. A pureza dos DNAs também foi avaliada através da relação das leituras

espectrofotométricas, nos comprimentos de onda 260/280 nm. No momento da transfecção, os respectivos DNAs foram esterilizados, utilizando-se filtros de 0,22 µm.

4.7.2.2 Padronização da Transfecção de Células CHO com o Plasmídeo pValac:gfp, Utilizando o Reagente Lipofectamine 2000™ (Invitrogen)

As células CHO, crescidas até formação da monocamada (item 4.7.1), foram tripsinizadas, transferidas para um tubo tipo *falcon* e centrifugadas a 81 g durante 5 minutos, a 25°C. O precipitado celular foi ressuspendido em 2 mL de meio F12 completo para contagem das células em câmara de Neubauer ou em contador automático *Contador de Células e Partículas Beckman Coulter Z1*, conforme recomendações do fabricante. Placas de 6 poços foram utilizadas para transfecção, sendo que a cada poço foram adicionadas cerca de 200.000 células e 2 mL de meio completo. As células foram mantidas por 48 horas a 37°C em estufa de CO₂ a fim de obter uma confluência de 90-95% necessária para a transfecção.

Uma vez atingida a confluência desejada, o meio de cultura das placas foi substituído por 1,5 mL de meio F12 completo, adicionados a cada poço. Foram utilizados 4 µg de DNA (pValac:gfp) diluídos em 250 µL de meio *Opti-MEM® I Reduced Serum Media* (Invitrogen) e o reagente Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) nas proporções “DNA(µg):Lipofectamine(µL)” de 1:2, 1:2,5 e 1:3, também diluídas em 250 µL de *Opti-MEM®*. As diluições “DNA – Opti-MEM” e “Lipofectamine – Opti-MEM” foram incubadas, separadamente, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o DNA e o reagente Lipofectamine foram misturados para vesicularização do DNA nos lipossomos, sendo mantidos 20 minutos em repouso à temperatura ambiente. Cada poço recebeu a mistura DNA:Lipofectamine (cerca de 520 µL por poço) e as placas foram incubadas a 37°C por 24, 48 e 72 horas para verificação da expressão da proteína GFP. O controle negativo do experimento consistiu em submeter às células ao tratamento com Lipofectamine e Optimem, mas não à transfecção com DNA. Como o meio de cultura pode ser trocado após 4 horas da transfecção, duas condições foram também testadas: manutenção do meio de cultura inicial ou sua troca por meio F12

completo fresco, contendo 1% de uma suspensão de antibiótico e antimicótico estabilizada (Sigma).

Assim, após a transfecção celular com o plasmídeo pValac:*gfp*, a fluorescência da proteína GFP pôde ser visualizada em microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert 200, utilizando-se o filtro azul (objetiva de 20X), e a imagem capturada em câmera AxioCam HRc (ZEISS), utilizando-se o programa AxioVision 4.8.1.

4.7.2.3 Transfecção de Células CHO com o Plasmídeo pValac:Ag85A

A partir da padronização da transfecção celular com o plasmídeo pValac:*gfp*, todos os experimentos de transfecção que se seguiram foram realizados nas melhores condições obtidas, utilizando-se, então o plasmídeo pValac:Ag85A. Em todas as transfecções seguintes, sempre foi feito por placa um controle positivo utilizando o plasmídeo pValac:*gfp*.

4.7.3 Verificação da Funcionalidade do Plasmídeo pValac:Ag85A em Cultura de Células Mamíferas

Com o objetivo de avaliar a funcionalidade do plasmídeo pValac:Ag85A, as culturas de células transfectadas com o referido plasmídeo foram analisadas quanto a expressão da proteína Ag85A através da técnica de Imunocitoquímica, com posteriores análises em Microscopia Confocal e também por Citometria de Fluxo.

4.7.3.1 Visualização da Proteína Ag85A por Reação de Imunofluorescência para Análise em Microscopia Confocal.

Para a realização da técnica de Imunocitoquímica e posterior análise por Microscopia Confocal, as células CHO foram transfectadas conforme o item 4.7.2. A placa foi montada depositando-se primeiramente uma lamínula no fundo de cada poço, para se obter crescimento celular na superfície da mesma. Após 48 horas da transfecção com o pValac:Ag85A, realizou-se a confecção de lâminas para detecção

da proteína Ag85A. Lâminas de células não transfectadas (controle negativo das células), de células transfectadas e tratadas somente com anticorpo secundário (controle negativo do anticorpo secundário) e de células transfectadas com o plasmídeo pValac:*gfp* (controle positivo), também foram confeccionadas.

O meio da cultura celular foi retirado dos poços, estes foram lavados duas vezes com 1 mL de PBS 1X (do inglês- *Phosphate Buffered Saline*) (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) e, em seguida, as células foram fixadas com 700 µL de paraformaldeído 4% (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito), durante 15 minutos sem agitação. Transcorrido esse tempo, as células foram lavadas novamente com 1 mL de PBS. Para permeabilização das células, foram acrescentados 700 µL de Triton X-100 (0,1% em PBS) (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) e a mistura foi incubada por 10 minutos. Posteriormente, procedeu-se a incubação com o anticorpo primário monoclonal DT-17 (*mouse monoclonal Ag85A*, gentilmente doado pela professora K. Huygens do *Operational Directorate Communicable and Infectious Diseases* - Bruxelas), na diluição 1:20 em PBS/BSA 1% (BSA do inglês- *Bovine Serum Albumin*) vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito). Para cada lamínula, 100 µL do anticorpo primário diluído foram depositados sobre elas e assim, foram incubadas em câmara úmida por duas horas à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, as lamínulas foram lavadas 5 vezes com 1 mL de PBS, com agitação suave durante 3 minutos para cada lavagem. Posteriormente, elas foram incubadas com 100 µL do anticorpo secundário IgG anti-mouse marcado com Alexa-Fluor 488 (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Invitrogen), na diluição 1:500 em PBS/BSA 1%, em câmara úmida durante uma hora à temperatura ambiente.

Logo após, as lamínulas com as células transfectadas foram tratadas com o anticorpo primário e secundário, como descrito anteriormente (positivo da reação), ou somente com anticorpo secundário (controle negativo do anticorpo secundário). A marcação nuclear foi feita pela incubação com o fluorocromo DAPI (4,6'-diamidino-2-phenilindol – Invitrogen), fluorocromo este, que tem afinidade pelas regiões ricas em A-T do DNA, na concentração final de 2 µg/mL. Após várias lavagens com 1 mL de PBS, as lamínulas foram dispostas sobre lâminas com meio *Hydramount* (Merck) ou glicerina

tamponada (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) e seladas para posterior observação microscópica.

As lâminas montadas foram visualizadas em Microscópio de Varredura a Laser Confocal, modelo LSM 510 Meta Zeiss, utilizando-se a objetiva de 40X e também de 63X, com óleo de imersão. Para detecção da fluorescência do Alexa flúor 488, foi utilizado o laser de argônio e o filtro azul, com emissão máxima a 520 nm. Para detecção do DAPI, foi utilizado a epifluorescência do mesmo microscópio, utilizando-se o filtro para DAPI, com emissão na faixa de 461 nm. A co-localização das imagens com dupla marcação foi realizada pela sobreposição das imagens digitais separadas de cada fluorocromo, imagens estas visualizadas e editadas no programa *Zeiss LSM Image Browser*.

4.7.3.2 Verificação da Produção da Proteína Aq85A por Reação de Imunofluorescência para Análise por Citometria de Fluxo.

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a análise de propriedades físicas e biológicas de populações e sub-populações celulares (Bacal e Faulhaber, 2003). Esta metodologia tem a capacidade de mensurar propriedades de células individuais, através do emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, óptica, substâncias fluorescentes e recursos de informática (Bertho, 2007). Quando uma amostra em solução é injetada no citômetro de fluxo, as células são ordenadas de tal forma que uma única célula por vez seja interceptada pelo laser; assim a dispersão de luz (*scatter*) e a emissão de fluorescência por células que foram marcadas com fluorocromos ou que expressam proteínas naturalmente fluorescentes fornecem informações sobre as propriedades destas células (Rahman, 2006). O parâmetro *Forward Scatter* (FSC) se relaciona com o tamanho celular e o *Side Scatter* (SSC), com a complexidade citoplasmática. A fluorescência emitida pelas células é detectada por fotodetectores de fluorescência (FL-1, o FL-2 e o FL-3, os quais são capazes de detectar diferentes comprimentos de onda emitidos pelos fluorocromos FITC (verde), PE (laranja) e Cy5 (vermelho), respectivamente). Medições da fluorescência emitida pelas células analisadas podem fornecer dados quantitativos e qualitativos sobre a

presença de receptores de membrana e mesmo de componentes intracitoplasmáticos ou nucleares (Rahman, 2006). Assim sendo, esta técnica apresenta um grande espectro de aplicações nas áreas médica e biotecnológica, incluindo estudos de subpopulações linfocíticas, análises de expressão gênica, diagnósticos de doenças, análises de ciclo celular e pesquisas que envolvam vacinas de DNA (Bertho, 2007; Badger *et al.*, 2011).

Assim, outra metodologia adotada neste trabalho visando verificar a funcionalidade do plasmídeo pValac:Ag85A, no que concerne à presença da proteína Ag85A nas células eucarióticas transfectadas com o referido plasmídeo, foi a realização de reações de imunofluorescência para posteriores análises através da técnica de citometria de fluxo. Para tanto, células eucarióticas da linhagem CHO foram transfectadas conforme o item 5.7.2. Após 48 horas da transfecção com os plasmídeos pValac:Ag85A e pValac:gfp (controle positivo), as células foram tripsinizadas, com 1 mL de tripsina, e centrifugadas para posterior contagem das mesmas em câmara de Neubauer. A marcação celular foi realizada em placas de cultura de células de 96 poços com fundo em U (*Sarstedt EEUU*). A reação de marcação foi feita com kit *FoxP3 Staining Buffer set BD Biosciences*[®], segundo as recomendações do fabricante. Para tanto, a cada poço foi adicionado uma suspensão celular ajustada na concentração de 1×10^6 células por mL. Logo após, a placa foi centrifugada a 182 g, 4°C, durante 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento homogeneizado. Após ressuspender o sedimento em 200 µL de tampão de fixação BD, previamente diluído 20 vezes em PBS, a placa foi incubada por 30 minutos, 4°C, ao abrigo da luz. Finalizada essa incubação, a placa foi novamente centrifugada nas condições citadas e o sobrenadante foi desprezado. As células foram lavadas com 150 µL de tampão de permeabilização fornecido pelo kit (tampão mantido a 37°C) e posteriormente a placa foi novamente centrifugada nas condições já citadas. Mais uma lavagem foi realizada, com 200 µL da solução PBS-Wash, e, posteriormente, uma centrifugação à 182 g por 10 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante e homogeneizado do sedimento celular, foram adicionados a cada poço 10 µL do anticorpo primário monoclonal DT-17 (*mouse monoclonal anti-Ag85A*) na diluição 1:20 e a placa foi incubada à temperatura ambiente, durante 30 minutos ao abrigo da luz. Transcorrido esse tempo as células

foram lavadas novamente com 200 μ L da solução PBS-Wash e centrifugadas à 182 g à 4°C, por 10 minutos, procedimento este realizado duas vezes. Ao *pellet* de células foram acrescentados 10 μ L de anticorpo secundário anti-IgG marcado com Alexa flúor 488 (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Invitrogen) em uma diluição de 1:500, e, novamente, a placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após esse tempo, as células foram lavadas e centrifugadas, por duas vezes, nas mesmas condições já citadas. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento final foi fixado em 200 μ L de paraformaldeído 3% (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito), e transferido para tubos apropriados de 5 mL para estocagem a 4°C ao abrigo da luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo. Como controles negativos do ensaio, células não transfectadas e células transfectadas e tratadas somente com anticorpo secundário (controle negativo do anticorpo secundário), foram utilizadas. O controle positivo do experimento consistiu de células transfectadas com o plasmídeo pValac:gfp.

4.8 Obtenção de *Lactococcus lactis* FnBPA⁺ Carreando o Vetor pValac:Ag85A.

4.8.1 Confeção de Células Eletrocompetentes de *L. lactis* FnBPA⁺

Para a confecção das células electrocompetentes *L. lactis* FnBPA⁺, primeiramente foi realizado um inóculo com 10 μ L do estoque da referida linhagem em 5 mL de meio M17 suplementado com Sacarose (0,5 M) e Glicose (0,5%; M17-Sac-Gli) tamponada (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito), acrescido com 5 μ g/mL do antibiótico eritromicina (Ery). Este inóculo foi mantido a 30°C, sem agitação, por aproximadamente 20 horas. Transcorrido esse período, foi realizado um segundo inóculo utilizando-se 100 μ L dessa primeira cultura em 5 mL de meio M17-Sac-Gli acrescido de 5 μ g/mL de eritromicina, e posterior incubação à 30°C, sem agitação, durante 8 horas. Após esse tempo, 1 μ L desta cultura foi inoculado em 200 mL de meio M17-Sac-Gli acrescido de 1% de glicina até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) em torno de 0,4 - 0,6. Uma vez alcançado o crescimento desejado, a

cultura foi centrifugada a 2021 g, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspensão em 200 mL de uma solução gelada e estéril de sacarose 0,5M tamponada (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) e glicerol 10%. O processo de centrifugação e lavagem foi repetido por mais quatro vezes e, após a última lavagem, o precipitado celular unificado foi ressuspensão em 1 mL da solução estéril de PEG3000 30% (Polyethylene glycol 3000) tamponada (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) e glicerol 10%. Alíquotas de 100 µL dessas células foram estocadas a -70°C até o momento do uso.

4.8.2 Transformação de *L. lactis* FnBPA+ com o Plasmídeo pValac:Ag85A

Um volume do plasmídeo pValac:Ag85A correspondente a 100 ng/µL foi misturado a uma alíquota de 100 µL de células eletrocompetentes de *L. lactis* FnBpA⁺ preparadas conforme item 4.8.1. A mistura foi incubada no gelo durante 5 minutos e posteriormente, transferida para cubetas de electroporação de 2mm. A transformação se deu por electroporação, utilizando-se o aparelho *GenePulser XCell*TM (BIO-RAD), sob as seguintes condições: 2.400 V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω. Imediatamente após o pulso, 1mL de M17-Sac-Gli foi adicionado às células e a mistura foi então mantida a 30°C por 4 horas, sem agitação. Para o controle negativo, 100 µL de células eletrocompetentes foram electroporadas sem adição de qualquer plasmídeo.

O processo de seleção dos transformantes consistiu em semear alíquotas da suspensão de células electroporadas em placas contendo M17-Sac-Gli Agar, acrescidas de Cm (5 µg/mL) e Ery (2,5 µg/mL). As placas foram mantidas a 30°C por aproximadamente 24 horas, e após este período, foi avaliada a presença de colônias resistentes tanto à Cm quanto à Ery.

A próxima etapa consistiu na seleção de clones presentes nas placas para proceder com a extração de plasmídeos e assim, confirmar a presença do plasmídeo pValac:Ag85A, como também a presença do plasmídeo pOri23:fnbpA, presente na linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA⁺.

4.8.3 Extração do DNA Plasmideano de *L. lactis* FnBPA+ (pValac:Ag85A)

As colônias resultantes da transformação de *L. lactis* FnBPA⁺ com o plasmídeo pValac:Ag85A foram inoculadas em 5 mL de meio M17-Gli suplementado com Ery (2,5 µg/mL) e Cm (5 µg/mL) e a cultura foi mantida a 30°C por aproximadamente 18 horas, sem agitação. Uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi estocada a -80°C, utilizando-se glicerol 80% na proporção de 1:4. Para a extração plasmideana, foi utilizado o método de lise alcalina assim como descrito no item 4.5.3, com a seguinte modificação: após a primeira centrifugação, foram adicionados ao precipitado celular 250 µL de TE-Lisozima (TE-LYS) tamponada (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) e a mistura foi incubada a 37°C por meia hora. Após este período, seguiu-se normalmente o protocolo descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), conforme o item 4.5.3.

A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese, seguindo os mesmos parâmetros já descritos no item 4.3, e também através da relação das leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda 260/280 nm.

4.8.4 Confirmação dos Clones *L. lactis* FnBPA+ Carreadores do Plasmídeo pValac:Ag85

No intuito de se confirmar a obtenção de clones da linhagem de *L. lactis* FnBPA⁺ portadores dos plasmídeos pOri23:*fnbpa* e pValac:Ag85A, os plasmídeos extraídos (item 5.8.3) foram submetidos à reação de PCR. Estas foram preparadas com 5 µL de tampão 5X Green Go Taq[®] Flexi (Promega), 2 µL de MgCl₂ 25 mM (Promega), 1 µL de dNTP 10 mM, 0,5 µL do *primers* Ag85AF e Ag85AR (tabela 4), ambos a 100 pmol/µL, 0,3 µL da enzima DNA polimerase Go Taq[®] 5 U/µL (Promega), 14,7 µL de água ultrapura estéril e 1,0 µL (100 ng/µL) do DNA plasmideano. Além da confirmação da presença do plasmídeo pValac:Ag85A nos clones por meio da utilização de *primers* específicos para a ORF Ag85A, foi realizada também uma reação de PCR utilizando-se *primers* específicos para a fibronectina (FnBPAF e FnBPAR; Tabela 5), para também

confirmar a presença do plasmídeo pOri23:*fnbpA* nos mesmos (o que caracteriza a linhagem *L. lactis* FnBPA⁺). Ao controle negativo, nenhum DNA foi acrescentado. As reações ocorreram em um aparelho termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) sob as condições apresentadas na tabela 6 para a ORF *Ag85A* e tabela 7 para a ORF FnBPA.

Tabela 7: Condições da PCR utilizadas para amplificar a ORF FnBPA do plasmídeo pOri23 pertencente à linhagem *L.lactis* invasiva.

| Pasos | Temperatura | Ciclos | Tempo |
|-------|-------------|--------|----------|
| 1 | 94°C | | 00:05:00 |
| 2 | 94°C | 29 X | 00:01:00 |
| 3 | 50°C | 29 X | 00:00:30 |
| 4 | 72°C | 29 X | 00:02:00 |
| 5 | 72°C | | 00:07:00 |
| 6 | 4°C | | Hold |

4.9 Padronização das Curvas de Crescimento Bacteriano Para os Experimentos de Imunização

A fim de estabelecer a relação entre a densidade óptica (crescimento bacteriano) e o número de colônias (UFC) das linhagens bacterianas a serem administradas nos animais, foram realizadas curvas de crescimento. Primeiramente, foram realizados inóculos de cada uma das linhagens citadas a seguir: *L. lactis* FnBPA⁺ e *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:*Ag85A*). Para tanto, 10 µL do estoque de cada linhagem foram inoculados em 5 mL de meio M17 suplementado com Sacarose (0,5 M) (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) e Glicose (0,5%; M17-Gli), acrescido dos antibióticos correspondentes (Cm 10 µg/mL e Ery 5 µg/mL), quando necessário e então foram mantidos a 30°C, sem agitação por aproximadamente 20 horas. Para a linhagem *L. lactis* FnBPA pValac, os dois antibióticos foram necessários, assim, utilizou-se Cm 5 µg/mL e Ery 2,5 µg/mL.

Transcorrido esse período, foi realizado um segundo inóculo, de cada linhagem em duplicata biológica, utilizando-se 150 µL dessa primeira cultura em 15 mL de meio M17-Gli acrescido com o antibiótico correspondente quando necessário (inóculo a 1%)

e posterior incubação a 30°C, sem agitação. As culturas foram crescidas durante um período de 10 horas, sendo que, durante esse período, a densidade óptica a 600 nm foi medida de hora em hora, para cada linhagem em questão. No tempo de 4, 6 e 8 horas, além da medição da DO_{600nm}, foram realizadas também diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁸) a partir de 100 µL da cultura celular. As diluições 10⁻⁴, 10⁻⁶ e 10⁻⁸ foram plaqueadas em meio sólido M17 acrescido do antibiótico correspondente para cada linhagem, quando necessário. As placas foram então mantidas em estufa, a 30°C, durante 18 horas, período após o qual foi realizada a contagem das colônias e, em seguida, o cálculo para verificação da UFC.

4.10 Ensaio de Imunização com a Linhagem *L. lactis* FnBPA (pValac:Ag85A) e avaliação da Resposta Imune Gerada

4.10.1 Animais Utilizados Para os Experimentos de Imunização

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas, com 4-5 semanas de idade provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (Cebio – UFMG). Os animais receberam água filtrada e ração sem restrições durante todo o experimento.

Todos os animais utilizados neste experimento foram mantidos em grupos de cinco camundongos por gaiola de plástico própria, com dimensões de 30x20x13 cm. O biotério utilizado tem instalações próprias, com uma sala para acomodação dos animais, contando com temperatura controlada, controle de luz de 12 horas e exaustor tanto para redução do odor como para circulação do ar.

Os animais foram recebidos com 4-5 semanas, após isso, iniciou-se a vermifugação. O vermifugo Ivermectina a 1% (Agener União) foi dissolvido na água de beber dos camundongos, sendo utilizados 500 µL do vermífugo para cada 500 mL de água filtrada (concentração final de 0,001%). Os animais tomaram o vermifugo por 7 dias consecutivos na mamadeira, em seguida o tratamento foi interrompido por 7 dias (pausa) e assim foi iniciado o experimento de imunização duas semanas após o

recebimento dos animais, e assim, os camundongos já apresentavam 6-7 semanas de idade.

Cabe salientar que todos os procedimentos aqui descritos com animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA/UFMG, protocolo número 66/2011).

4.10.2 Imunização dos Camundongos C57BL/6

A via intranasal, foi a via de imunização empregada nos camundongos. Para imobilização dos mesmos foi utilizada a contenção manual. Os grupos experimentais utilizados foram os seguintes: Solução NaCl 0,9% como controle negativo do experimento; *L. lactis* FnBPA⁺ (bactéria invasiva); *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A); 100 µL de BCG (vacina- 5 x 10⁶ UFC) (Fan, Gao e Fu 2009) como controle funcional do experimento. Cabe salientar que a BCG foi administrada via subcutânea, seguindo o mesmo esquema de imunização que o utilizado para a linhagem *L. lactis* FnBPA⁺(pValac:Ag85A), porém, com a diferença que foi administrada somente uma dose só a cada 15 dias, em lugar de três dias consecutivos.

As doses vacinais foram preparadas através do congelamento da cultura bacteriana em glicerol 20% uma vez que atingiram D.O correspondente ao último ponto da fase exponencial da curva de crescimento descrita no item 4.9 para cada bactéria correspondente. Para isto, foi realizado um inóculo *overnight* de cada linhagem em meio M17 suplementado com Glicose 0,5% e seus respectivos antibióticos, a 30°C e sem agitação. No dia seguinte, um novo inóculo foi feito, ajustando-se DO para 0,3 a partir do primer inóculo em volume final de 100 mL. Ao chegar na D.O correspondente, cada linhagem foi centrifugada e concentrada em 1 mL de cultura, e posteriormente estocada em glicerol 80%, para serem mantidas a -80°C até o momento da imunização.

Para contagem das UFC uma alíquota de 100 µL da dose vacinal já congelada por alguns dias em glicerol 80% foi plaqueada nas diluições: 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰, em duplicata, sendo assim possível a determinação das UFC/mL, como também da viabilidade das diferentes linhagens bacterianas após congelamento.

Assim, uma vez avaliadas e confirmadas tanto a UFC como a viabilidade das bactérias, procedeu-se à imunização dos animais. Para isso, os camundongos receberam por via intranasal 2×10^9 UFC (10 μ L da suspensão bacteriana em cada narina) de cada linhagem de *L. lactis* citadas no referido trabalho. As imunizações aconteceram nos dias 1, 15 e 30, sendo que cada um destes pontos foram realizados por três dias consecutivos, como apresentado no esquema da figura 10.

4.10.3 Coleta do Soro dos Animais Imunizados

A coleta de sangue foi realizada durante o experimento nos dias 0, 15 e 30 (Figura 10) para separação do soro e avaliação da resposta imune humoral (IgG e seu isotipo IgG1, como também IgA). A sangria foi realizada pelo plexo retro orbital dos animais. O volume extraído foi de aproximadamente 400 μ L, coletado em micro tubos, que foram colocados em estufa a 37°C por aproximadamente 1 hora, logo colocados a 4°C por 30 minutos e finalizado este tempo foram centrifugados a 8.491 g durante 7 minutos. O soro foi separado do coagulado sanguíneo e armazenado no freezer a -20°C até o momento dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA, do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

A eutanásia dos animais foi realizada no dia 45, para isso os animais foram devidamente anestesiados, utilizando-se ketamina (60,0mg/Kg) e xilazina (8,0mg/Kg) administrada intraperitonealmente. O sangue foi novamente coletado (aproximadamente 1,5mL), pela artéria aorta abdominal. Foi realizada também o lavado broncoalveolar (BAL) dos animais, como também a separação do baço em condições de esterilidade.

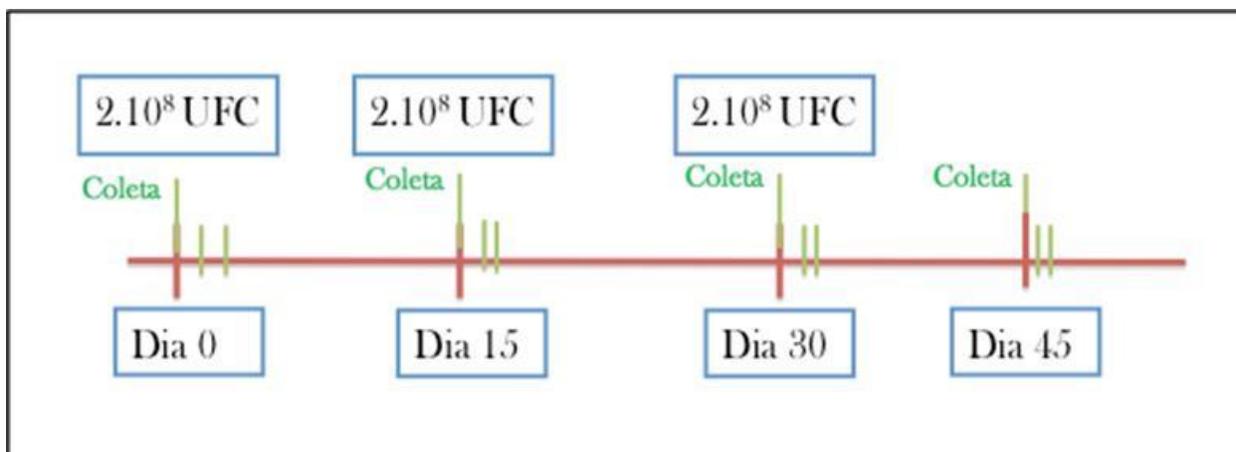


Figure 10: Esquematização das imunizações e coletas do sangue dos camundongos com as linhagens vacinais de *L. lactis*. As imunizações ocorreram durante três dias consecutivos a cada 15 dias (dias 1, 2 e 3; dias 15, 16 e 17; dias 29, 30 e 31), sendo que para cada imunização foi utilizado 2×10^8 UFC bacteriana. O sangue foi coletado antes dos animais serem imunizados (dias zero, 15, 29 e 45, correspondente ao dia da eutanásia).

4.10.3.1 Extração do Lavado Broncoalveolar

A lavagem broncoalveolar foi realizada com fins da obtenção de amostras das vias aéreas superiores. O referido material biológico foi coletado injetando-se com micro cânula 200 μ L de PBS 1X na traqueia dos animais já eutanasiados. O material colhido foi armazenado no freezer a -80°C até o momento de sua utilização, com o intuito de avaliar a resposta imune das mucosas, especificamente IgA secretória, como também o perfil de citocinas representante da resposta imune celular.

4.10.4 Processamento do Baço para Cultura de Células e Dosagem de Citocinas

Após o sacrifício, o baço dos animais foi coletado em 1 mL de meio RPMI e mantido em gelo. Em câmara de fluxo laminar o extrato celular do baço foi obtido utilizando-se macerador autoclavado, sendo o extrato centrifugado 10 minutos 182 g a 4°C , e o pellet ressuspendido em 9 mL de água destilada estéril para lise das hemácias, sendo que em seguida 1 mL de PBS 10x foi adicionado. A mistura foi novamente centrifugada e o pellet ressuspendido em 1 mL de RPMI completo.

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) e 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 de baço por poço em placa de 96 wells (NUNC).

As culturas foram então estimuladas com 5 µg/mL da proteína recombinante rAg85A. A proteína recombinante foi adquirida da empresa ABCAM (ABCAM-P0A4V2). Esta proteína não possui LPS devido a que é proveniente de células de Baculovirus infectado. O comerciante revela um 90% de pureza por SDS-PAGE. A referida proteína possuía a concentração de 0,5 µg/ml. Uma amostra de cada grupo experimental foi estimulada com Concanavalina A na concentração de 16 µg/ml. Em seguida, o volume de cada poço foi completado para 200 µL com RPMI completo.

As placas foram mantidas a 37°C em estufa de CO₂ por 48 horas. Após este período, o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C até o momento da realização da técnica de CBA (CBA - *cytometric beads array*).

As carcaças dos camundongos foram devidamente descartadas em sacos plásticos para lixo biológico (lixo contaminado) e mantidas em freezer até o recolhimento para descarte adequado realizado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB).

4.10.5 Caracterização do Perfil da Resposta Imune Humoral

4.10.5.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para Dosagem de Anticorpos

A resposta imune humoral foi avaliada através da produção de anticorpos específicos anti-Ag85A das Imunoglobulinas IgA, IgG e seu isotipo IgG1, no soro dos animais imunizados.

Para dosagem de IgA e IgG específica para Ag85A, a placa foi sensibilizada com a proteína rAg85A (0,25 µg/poço)-proteína diluída em tampão carbonato, *coating buffer*-(vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito). Após 18 horas de incubação em câmara úmida a 4°C, a placa foi lavada 3 vezes com Salina-Tween (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) e bloqueada com PBS-caseína (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) durante 1 hora

a temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi lavada 3 vezes com Salina-Tween e as amostras foram adicionadas. As amostras do BAL não foram diluídas, já as amostras de soro foram diluídas a 1:25, para todas as subclasses de Imunoglobulinas. As amostras foram diluídas em PBS-Tween 20, (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) e assim, as placas foram incubadas por mais uma hora a 37°C.

Após esse período, a placa foi lavada novamente com Salina-Tween (5 vezes) e incubada com o anticorpo anti-mouse IgA ou IgG conjugados com biotina (Southern Biotechnology). As diluições aplicadas aos anticorpos foram realizadas com PBS caseína -(vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito), assim sendo, 1:8.000 para IgA, 1:2.500 para IgG, 1:1.000 IgG1 respectivamente. Após 1 hora de incubação a 37°C, a placa foi novamente lavada (5 vezes) e incubada, com Estreptavidina conjugada à peroxidase (Estreptavidina-HPR, Southern Biotechnology) diluída 1:10.000 em PBS-caseína, por 1 hora a 37°C.

Finalmente, após 5 lavagens com Salina-Tween, a revelação foi feita através da incubação com a solução reveladora de OPD (ortofenilenodiamino) em tampão citrato e H₂O₂ (-vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito). A placa foi incubada ao abrigo da luz até o desenvolvimento da cor (30 minutos aproximadamente). A reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico 2N (vide anexo Seção I- Meios e Soluções ao final do manuscrito) e a leitura foi realizada em leitor de ELISA (*Expert Plus Microplate Reader*) no comprimento de onda de 492 nm.

4.10.6 Caracterização do Perfil da Resposta Imune Celular

4.10.6.1 Citometria de Fluxo (CBA-cytometric beads array) para Dosagem de Citocinas

A resposta imune celular foi avaliada através da produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL6 e IL17. Para tanto foi utilizando o kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17, Cytokine Kit, no sobrenadante da cultura e no BAL dos animais imunizados.

Primeiramente foi ressuspendido o padrão, providenciado pelo Kit, e segundo recomendações do fabricante, foram realizadas as seguintes diluições 1:2, 1:4, 1:8,

1:16, 1:32, 1:64, 1:128, e 1:256, com a finalidade de realizar a curva padrão que foi utilizada nas análises. Posteriormente foi realizado a mistura das *beads* a serem analisadas, segundo recomendações do fabricante. Logo, foram colocadas 25 µl dessa mistura com 25 µl de cada amostra em um micro tubo. Finalmente foram acrescentados 25 µl do reagente de detecção PE (ficoeritrina) Th1/Th2/Th17 e as amostras foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Transcorrido esse tempo, foram acrescentados 500 µL de Buffer de lavagem, fornecido pelo kit, e as amostras foram centrifugadas 284 g por 5 minutos. Após finalizada essa etapa o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Por fim, foram acrescentados 150 µL de Buffer de lavagem às amostras e o pellet foi ressuspendido. Após esta última etapa as amostras foram levadas no citometro *Sampler accuri C6* para realização da leitura das beads. As leituras foram analisadas com o programa *FCAP Array software*.

4.11 Análises Estatísticas

A análise de variância foi realizada utilizando o teste de variância *One-Way ANOVA*, seguido do pós teste não paramétrico *Kruskal-Wallis: Dunn's multiple comparisons test*. Os valores com intervalo de confiança menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos. Todas as comparações foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego California, USA).

Os resultados estatísticos obtidos para resposta imune celular e humoral foram obtidos das leituras dos 5 animais de forma independente uns dos outros. Foram realizados três experimentos independentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Clonagem da ORF Ag85A no vetor pValac

O primeiro passo deste trabalho consistiu no isolamento, por PCR, da ORF *Ag85A* de *M. tuberculosis*, a partir do DNA genômico da linhagem H37Rv. Aos pares de iniciadores utilizados (Tabela 5), foram inseridos sítios artificiais de restrição (*Bam*HI e *Eco*RI) para que a ORF *Ag85A* pudesse ser clonada de forma direcionada e na fase de leitura correta no vetor pValac.

5.1.1 Amplificação da ORF Ag85A

Para a reação de amplificação foi utilizada a enzima DNA polimerase Pfx Platinum[®] (Invitrogen), cuja atividade é altamente estável e de alta especificidade e precisão, sendo ideal para amplificações por PCR que requerem taxas mínimas de mutações (inserções, deleções, ou trocas) durante a incorporação de nucleotídeos.

Neste contexto, foi verificada a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1.017 pb, assim como esperado para a ORF *Ag85A* de *M. tuberculosis*. O fragmento amplificado foi visualizado em gel de agarose a 1%. Como esperado, não foi observado nenhum produto de amplificação no controle negativo (Figura 11).

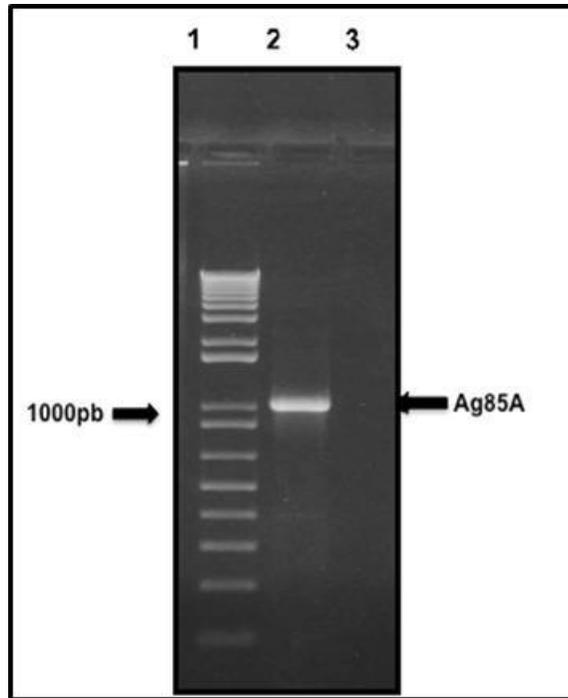


Figure 11: Análise do produto de amplificação por PCR da ORF Ag85A de *M. tuberculosis*. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Análise do produto de amplificação: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produtos da amplificação da ORF *Ag85A* de *M. tuberculosis*; Canaleta 3: Controle negativo da reação.

5.1.2 Clonagem da ORF Ag85A no sistema Zero Blunt® TOPO®

O fragmento amplificado (item 5.1.1) correspondente à sequência codificadora do gene *Ag85A* de *M. tuberculosis*, foi clonado no vetor Zero Blunt® TOPO®, um vetor linear que possui a topoisomerase I do vírus Vaccinia ligada covalentemente à extremidade 3' fosfato de cada fita de DNA. A ligação entre a topoisomerase I e o DNA do vetor é capaz de catalisar a reação de ligação do inserto neste, liberando assim, enzima inativa. Desta forma, obteve-se o plasmídeo pTP:*Ag85A*. A geração deste “plasmídeo intermediário” foi necessária para que, num momento posterior, a digestão enzimática deste permitisse a liberação do inserto (*Ag85A*) com extremidades coesivas, de modo a permitir a clonagem da referida ORF, de forma direcionada e em fase de leitura correta, no vetor pValac.

O plasmídeo pTP:Ag85A foi então utilizado para transformar células de *E. coli* Top10 eletrocompetentes. A seleção de colônias de *E. coli* recombinantes foi realizada em meio LB ágar contendo canamicina. Aproximadamente 18 horas após a transformação, foi possível a visualização de colônias recombinantes. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de transformação.

Dez colônias transformadas foram escolhidas de forma aleatória, inoculadas em meio líquido seletivo e incubadas à 37°C por 18 horas sob agitação constante. Essas culturas foram individualmente estocadas em glicerol 80% (1:1) para posterior confirmação da presença do plasmídeo pTP:Ag85A.

A fim de se confirmar a clonagem, os DNAs plasmideanos extraídos foram utilizados como molde para uma reação de PCR, utilizando os iniciadores específicos para a ORF Ag85A de *M. tuberculosis*. Os referidos plasmídeos extraídos da linhagem *E. coli* Top 10 também foram submetidos a uma reação de digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI, o que resultou em dois fragmentos visíveis: um de aproximadamente 1.017 pb, correspondente à ORF Ag85A e outro de 3.470 pb, correspondente ao vetor Zero Blunt® TOPO®

Embora vários clones tenham sido confirmados como portadores da ORF de interesse (Ag85A) apenas um deles foi utilizado para dar continuidade aos experimentos (Figura 12).

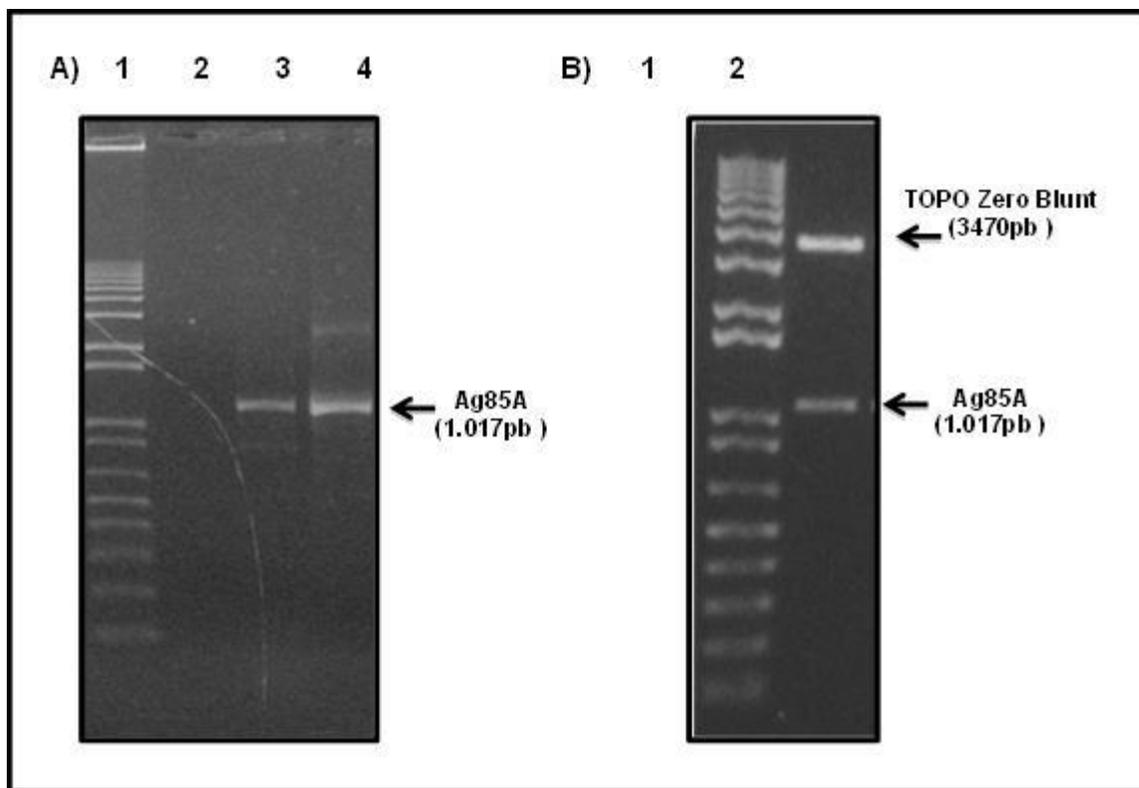


Figure 12: Amplificação por PCR da ORF Ag85A de *M. tuberculosis* e digestão enzimática a partir do DNA plasmideano extraído de células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pTP:Ag85A. . Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. A) Amplificação da ORF Ag85A. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo da reação de PCR; Canaleta 3: Controle positivo da PCR utilizando-se o DNA genômico de *M. tuberculosis*; Canaleta 4: Inseto Ag85A amplificado por PCR a partir do DNA plasmideano do clone de *E. coli* top10. B) Digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto da digestão enzimática, resultando nos fragmentos visíveis de 1.017pb e 3.470pb, correspondentes à ORF Ag85A e ao vetor Zero Blunt® TOPO®, respectivamente.

5.1.3 Clonagem da ORF Ag85A no vetor pValac

O plasmídeo de expressão eucariótica pValac:*gfp* (Guimarães *et al.*, 2009) foi extraído de *E. coli* e submetido a uma reação de digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI para a liberação da ORF *gfp* (696 pb) (Figura 13).

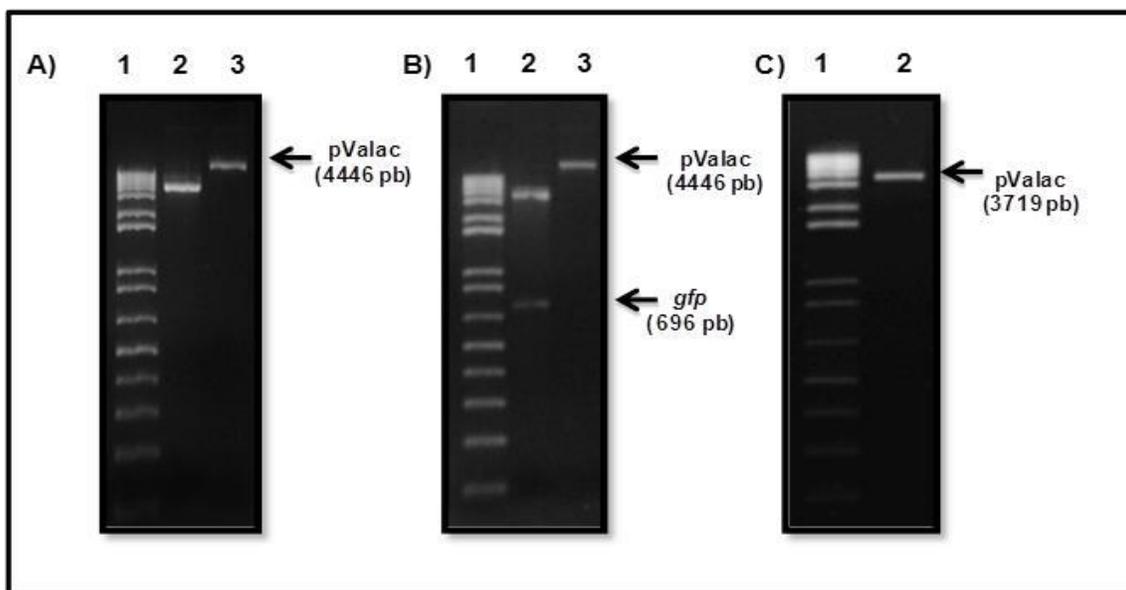


Figure 13: Análise do produto da extração plasmideana, digestão do pValac:gfp e purificação do vetor pValac. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. **A)** Análise do produto da extração plasmideana e Digestão com *EcoRI*: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto linear pValac:gfp (4.446 pb) gerado a partir da digestão com a enzima *EcoRI*; Canaleta 3: Produto pValac:gfp (4.446 pb) gerado a partir da extração plasmideana de *E. coli*. **B)** Análise do produto de Digestão enzimática: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); **Canaleta 2:** Produto da reação de digestão enzimática do pValac:gfp, utilizando-se as endonucleases *EcoRI* e *BamHI*, resultando em um fragmento de 3.719 pb (pValac) e 696 pb (*gfp*); Canaleta 3: Produto pValac:gfp (4.446 pb) gerado a partir da extração plasmideana de *E. coli*. **C)** Análise do produto pValac purificado: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto da purificação do pValac (3.719 pb) a partir do gel de agarose apresentado em B.

Simultaneamente, a ORF *Ag85A*, também com extremidades coesivas *BamHI* e *EcoRI*, foi obtida a partir do plasmídeo pTP:*Ag85A* para posterior ligação ao vetor pValac purificado.

Os produtos de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TG1. A seleção de colônias de *E. coli* transformadas com esses plasmídeos foi realizada em meio LB ágar contendo cloranfenicol. A visualização das colônias foi feita com aproximadamente 18 horas após a transformação. Assim, as colônias observadas foram inoculadas em meio líquido seletivo e incubadas a 37°C por

aproximadamente 18 horas. Transcorrido esse período, apenas 1 colônia demonstrou crescimento. Esta colônia foi então estocada em glicerol 80% para posterior extração dos plasmídeos recombinantes. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de eletroporação.

O DNA plasmideano extraído foi então utilizado como molde numa reação de PCR, usado os iniciadores específicos da ORF *Ag85A* de *M. tuberculosis*, para confirmar a presença do inserto no vetor pValac. Foi confirmado que o clone obtido era portador do inserto correspondente à ORF *Ag85A* (1.017 pb). A figura 14 mostra o produto de amplificação da ORF *Ag85A*. O controle negativo da reação, ao qual foi adicionado apenas água milli-Q estéril ao invés de DNA, não demonstrou nenhum sinal de amplificação. O DNA genômico de *M. tuberculosis* foi utilizado para o controle positivo da reação.

Concomitantemente, o vetor pValac:*Ag85A* foi submetido a uma reação de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI, o que resultou em dois fragmentos visíveis: 1.017 pb e 3.719 pb, correspondentes a ORF *Ag85A* e ao vetor pValac, respectivamente (Figura 14).

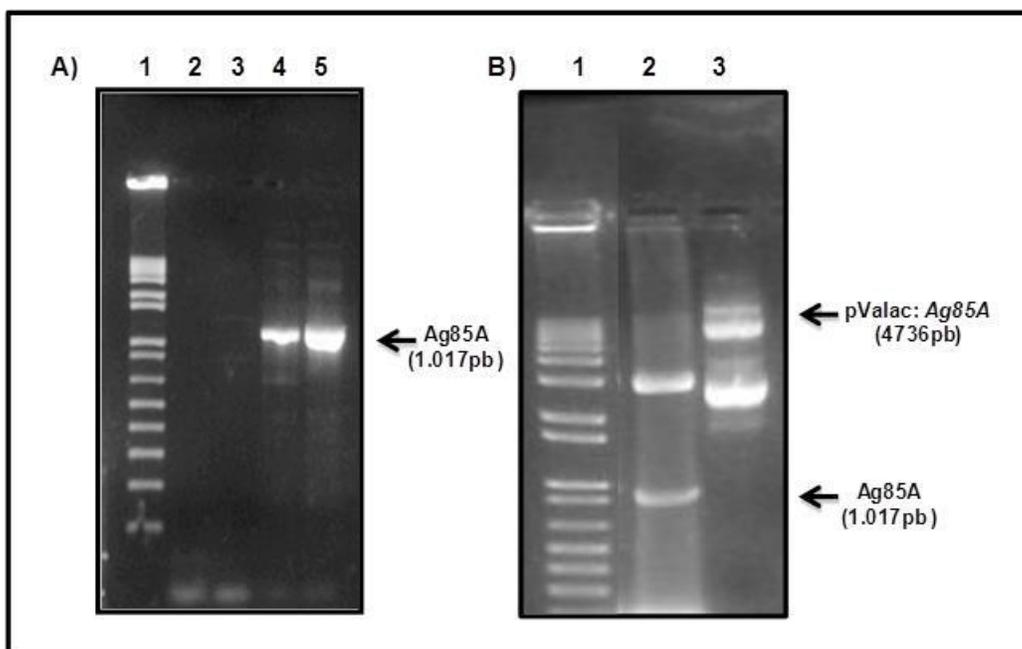


Figure 14: Análise do produto de amplificação por PCR da ORF Ag85A de *M. tuberculosis* e confirmação da presença da ORF Ag85A no vetor pValac por digestão enzimática. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. **A)** Confirmação da presença da ORF *Ag85A* no vetor pValac por PCR do clone pValac:*Ag85A*; Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaletas 2 e 3: Controles Negativos da reação de PCR, Canaleta 4: Controle positivo utilizando o DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv; Canaleta 5: Inseto *Ag85A* amplificado por PCR a partir do DNA plasmideano do clone de *E. coli* TG1. **B)** Digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI. B) Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Digestão enzimática evidenciando a ORF *Ag85A* com aproximadamente 1.017pb. Canaleta 3: Plasmídeo pValac:*Ag85A* sem digerir.

5.1.4 Reação de sequenciamento e análises *in silico*

O plasmídeo pValac:*Ag85A* foi extraído do clone de *E. coli*, previamente confirmado, tanto por PCR quanto por digestão enzimática, e submetido a reação de sequenciamento do inserto, utilizando-se os *primers* do vetor pValac e *primers* internos da ORF (ValF, ValR, Ag85AFi, Ag85ARi, tabela 5). Posteriormente, um *contig* único da sequência do clone foi obtido com o programa *CAP3 Sequence Assembly* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>), eliminando-se assim prováveis erros do sequenciamento. A partir desta sequência consenso, foi possível confirmar a presença

do inserto correspondente à sequência codificadora do gene *Ag85A* no plasmídeo pValac:*Ag85A*, através de alinhamento (BLASTn,) utilizando-se o banco de dados do NCBI. Além disso, através do sequenciamento, também foi possível verificar a presença do plasmídeo pValac, através de parte da região promotora do referido plasmídeo e da sequência sinal de poliadenilação (Poli-A), além da sequência de Kozak e dos sítios de restrição *Bam*HI e *Eco*RI no inserto clonado (Figura 15).



Figure 15: Sequência nucleotídica obtida através do sequenciamento do inserto contido no vetor pValac. Sequência em verde: Sequências nucleotídicas do vetor pValac; Sequência em azul: ORF *Ag85A*; Sequência em amarelo: Sequência de Kozak; Sequências em cinza: Sítios *Bam*HI e *Eco*RI. Códons sublinhados: códons de iniciação e término, respectivamente; Sequência em azul Turquesa: Sequência de poliadenilação (Poli-A).

Assim, com a obtenção e confirmação do plasmídeo pValac contendo a ORF *Ag85A* de *M. tuberculosis*, partiu-se então para a avaliação da funcionalidade deste plasmídeo.

5.2 Verificação da Funcionalidade do Plasmídeo pValac:Ag85A em Cultura de Células Mamíferas

Uma vez obtida e confirmada a construção pValac:Ag85A, o passo seguinte deste trabalho consistiu na verificação da funcionalidade do referido plasmídeo. Para isto, foram realizados experimentos para detecção da presença da proteína Ag85A, através da técnica de Imunocitoquímica.

5.2.1 Padronização da Transfecção Celular com o plasmídeo pValac:gfp

Foram testados algumas condições para a padronização e otimização da transfecção celular empregando-se o plasmídeo pValac:gfp. O reagente lipossômico Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) foi testado nas proporções “DNA(µg):Lipofectamine(µL)” de: 1:2, 1:2,5 e 1:3, sendo verificado visualmente por microscopia de fluorescência que a melhor condição obtida foi a proporção 1:3 de DNA (4 µg):Lipofectamine(12 µL). Além disso, a avaliação das células transfectadas foi realizada nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção, tendo sido observado os melhores níveis de expressão da proteína GFP entre 48 e 72 horas (Figura 16 D e E). A outra condição testada foi trocar ou não o meio de cultura, decorridas 4 horas da transfecção. O resultado deste último teste não mostrou diferenças com relação à expressão da proteína GFP pelas células, onde então se decidiu pela não-substituição do meio de cultura (Figura 16).

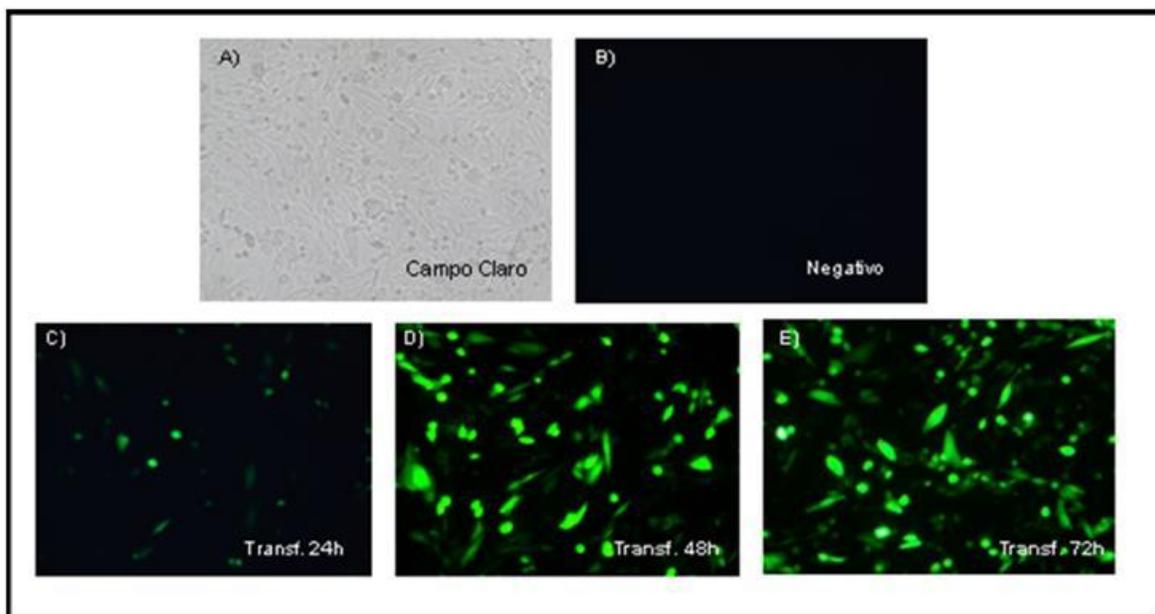


Figure 16: Resultado da padronização transfecção das células Flp-InTM-CHO (Invitrogen) com o plasmídeo pValac:gfp. A) Campo claro de células da linhagem CHO; B) Células CHO não transfectadas, com 48h; C) Células transfectadas com pValac:gfp na proporção de DNA (μg):Lipofectamine (μL) de 1:3, após 24 horas da transfecção; D) Células transfectadas com pValac:gfp na proporção de DNA (μg):Lipofectamine (μL) de 1:3, após 48 horas da transfecção; E) Células transfectadas com pValac:gfp na proporção de DNA (μg):Lipofectamine (μL) de 1:3, após 72 horas da transfecção. Todas as imagens foram obtidas em objetiva de 20X e filtro azul (exceto campo claro) em microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert 200, capturadas por câmera AxioCam HRc (ZEISS), utilizando-se o programa AxioVision 4.8.1.

5.2.2 Verificação da Produção, por Células Mamíferas da Linhagem CHO, da Proteína Ag85A

5.2.2.1 Reação de Imunofluorescência para análises de Microscopia Confocal

Para verificação da expressão da proteína Ag85A por células mamíferas da linhagem CHO, umas das técnicas utilizadas neste trabalho foi a Microscopia Confocal. Após 48 horas de transfecção com o plasmídeo vacinal pValac:Ag85A, nas células eucarióticas incubadas com anticorpo primário (MAb-DT17) e posteriormente com anticorpo secundário, anti-IgG, marcado com o fluoróforo Alexa 488, (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Invitrogen) foi possível a visualização da expressão da proteína Ag85A. Através da sobreposição das imagens (Figura 17 D e E) gerando a

figura 17 F, pôde-se visualizar a marcação da proteína Ag85A com o fluoróforo Alexa Flúor 488, em verde, e o núcleo celular, em azul, marcado com DAPI. Como controles negativos do experimento, foram utilizadas i) células CHO não transfectadas marcadas com ambos os anticorpos, no intuito de evidenciar que as células eucarióticas estudadas não apresentavam nenhuma proteína que reagisse com o anticorpo primário utilizado (figura 17 A) e ii) células CHO transfectadas, marcadas apenas com o anticorpo secundário (anti-IgG, marcado com o fluoróforo Alexa 488), no intuito de constatar ausência de ligação inespecífica por parte deste anticorpo. Nenhuma fluorescência foi visualizada no comprimento de onda da cor verde, resultando na imagem sobreposta onde apenas o núcleo de todas as células está marcado em azul (Figura 17 B). O controle positivo do ensaio consistiu de células eucarióticas transfectadas com plasmídeo pValac:*gfp* (Figura 17 C).

Deste modo pode-se confirmar a expressão da proteína Ag85A em células transfectadas e, conseqüentemente, a funcionalidade do plasmídeo em estudo, pValac:Ag85A.

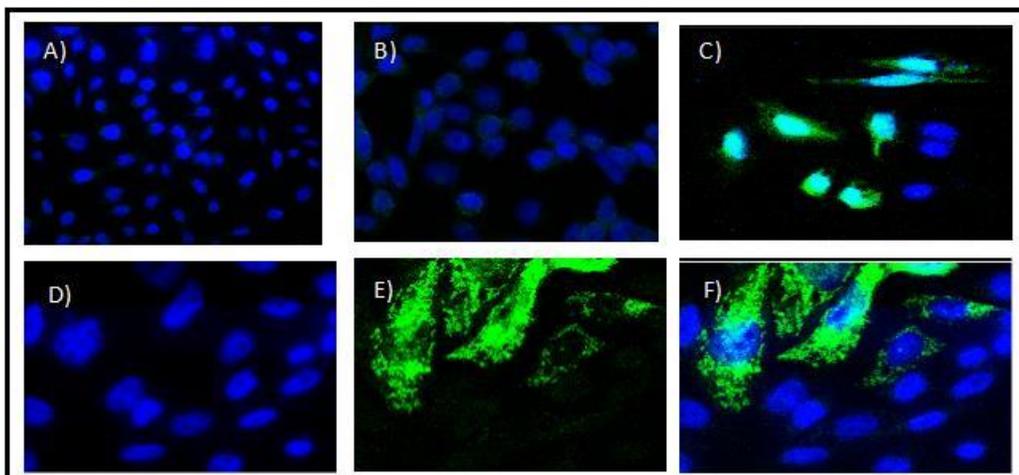


Figure 17: Imunocitoquímica utilizando-se microscopia confocal para confirmar a produção da proteína Ag85A em células da linhagem CHO. A) Células CHO não transfectadas incubadas com anticorpo primário anti-Ag85A, anticorpo secundário anti-IgG marcado com Alexa Flúor 488 e DAPI, sendo, este último, para a marcação do núcleo. **B)** Células CHO transfectadas com pValac:Ag85A incubadas somente com anticorpo secundário (A e B representam os controles negativos do experimento). **C)** Células transfectadas com pValac:gfp (Controle positivo). **D)** Células CHO transfectadas com pValac:Ag85A e incubadas com anticorpo primário anti-Ag85A, anticorpo secundário Alexa Flúor 488 e DAPI (imagem capturada apenas DAPI). **E)** Células CHO transfectadas com pValac:Ag85A e incubadas com anticorpo primário anti-Ag85A, anticorpo secundário Alexa Flúor 488 e DAPI (imagem capturada apenas Alexa 488). **F)** Sobreposição das imagens D e E (visualização da marcação da proteína Ag85A no citoplasma das células transfectadas com Alexa Flúor 488 e do núcleo com DAPI). As imagens A, B e C foram obtidas em objetiva de 40X e as imagens D, E e F em objetiva de 63X, utilizando Microscópio de Varredura a Laser Confocal, modelo LSM 510 Meta Zeiss.

5.2.2.2 Reação de Imunofluorescência para análises em Citômetro de Fluxo

Neste trabalho, a Citometria de Fluxo foi outra técnica utilizada a fim de constatar a expressão da proteína de interesse pelas células eucarióticas. O procedimento de transfecção foi realizado com o reagente comercial Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) e, decorridas 48 horas deste processo, realizou-se a técnica de imunofluorescência. As análises citométricas foram conduzidas em citômetro de fluxo FACScan (BD Bioscience), sendo os resultados obtidos, analisados através do

programa *FlowJo 7.6.4* (TreeStar Inc.). Os gráficos de dispersão de pontos, conhecidos como *dot plots* (Figuras 18 e 19 A e B) ilustram a porcentagem dos eventos adquiridos que foram selecionados para as análises, com base nos parâmetros tamanho e granulosidade das células (FSC e SSC, respectivamente). Como controle positivo do experimento, para verificar se a transfecção celular foi eficiente, células CHO foram transfectadas com o plasmídeo pValac:*gfp*; como controle negativo foram utilizadas células CHO não transfectadas.

Como pode ser observado na figura 18, observa-se o resultado expresso em *dot plot* [SSC (granulosidade)/FL1 (fluorescência específica)], das células CHO não transfectadas que apresentaram uma parcela de eventos fluorescentes de apenas 2,59% (Figura 18A), enquanto a porcentagem de células sem expressão representou 97,41%, o qual é esperado para células não transfectadas. A continuação foi verificada a eficiência de transfecção das células CHO com o plasmídeo pValac:*gfp* e a subsequente expressão do GFP pelas mesmas. Como mostra o *dot plot* representado na figura 18B, a expressão do GFP pelas células CHO foi de 95,54%, com uma intensidade mediana de fluorescência de 96,93, o que significa que a transfecção celular com o plasmídeo pValac:*gfp* foi muito eficiente e que maioria das células CHO expressaram quantidade alta da referida proteína. A combinação dos resultados obtidos entre as células CHO não transfectadas e as células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac:*gfp* é apresentado na Figura 18C em um histograma (Count (quantidade de eventos lidos)/FL1 (fluorescência específica)). Observa-se deslocamento à direita da curva representante das células expressando a proteína GFP, o que demonstra uma diferença de 93,67%, correspondente às células eficientemente transfectadas com o plasmídeo pValac:*gfp* que estão produzindo a referida proteína.

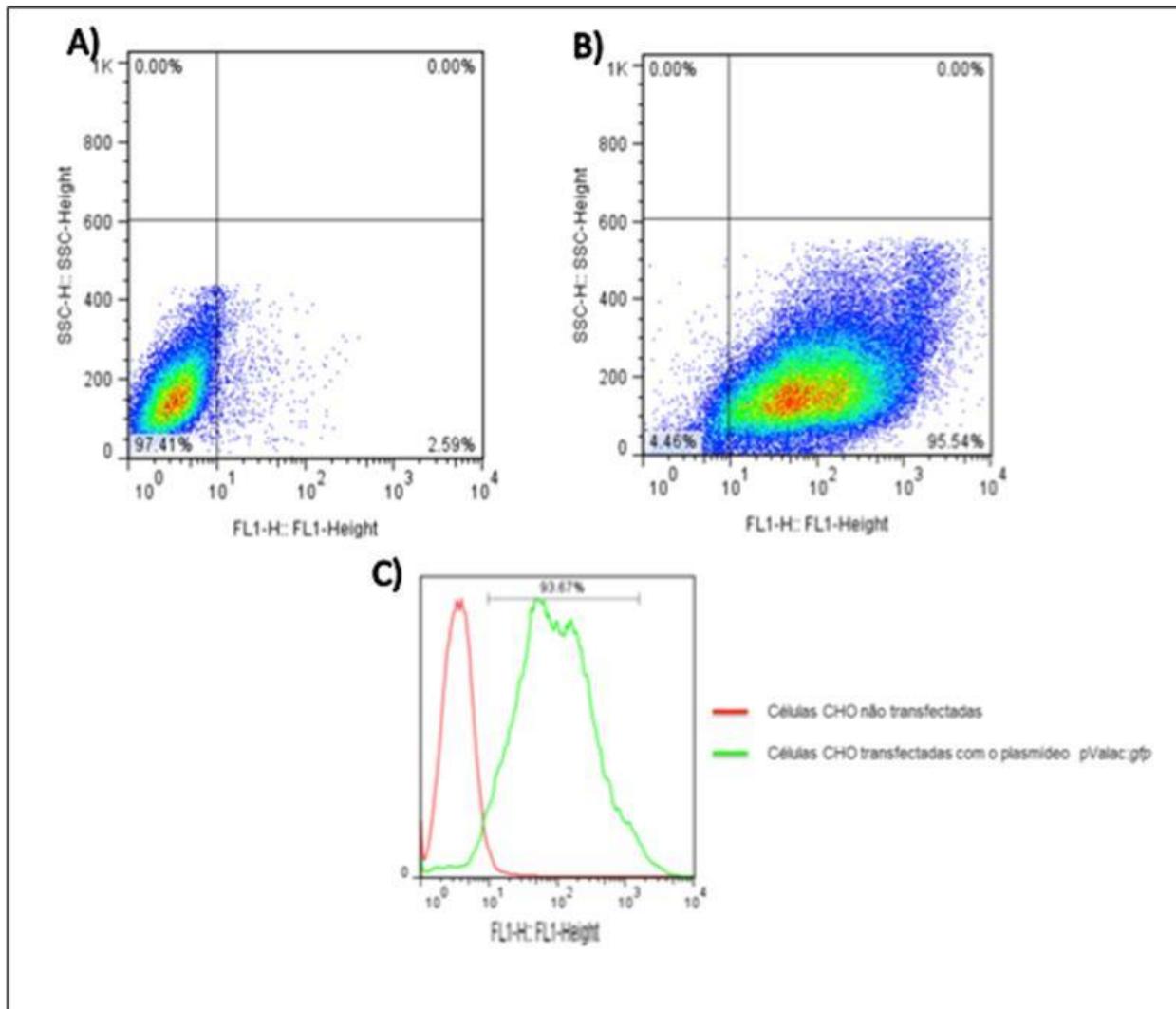


Figure 18: Detecção da produção da proteína verde fluorescente (GFP) por citometria de fluxo (FACS). *Dot plot* gerado pelo programa FlowJo. **A)** Células CHO não transfectadas; **B)** Células CHO expressando o GFP após transfecção com o plasmídeo pValac:gfp; **C)** Histograma gerado pelo programa FlowJo. Histograma contendo a combinação de resultados obtidos entre as células CHO não transfectadas e transfectadas com o plasmídeo pValac:gfp.

Para as análises da proteína recombinante Ag85A expressa nas células CHO se observa que as células não transfectadas submetidas ao mesmo processo de marcação que as células transfectadas, revelaram que 99,11% das mesmas não apresentaram fluorescência alguma (Figura 19 A), o que permite traçar o ponto de corte entre a não expressão da proteína Ag85A e a expressão detectável da mesma (controle negativo do ensaio). No entanto, ao analisar as células transfectadas com o

vetor pValac:Ag85A, submetidas ao processo de marcação imunocitoquímica, pode-se observar que 33,68% das células eucarióticas foram capazes de expressar a referida proteína (Figura 19 B).

Os resultados obtidos apresentam-se também combinados na figura 19 C, expressos em um histograma, [cont. (quantidade de eventos)/FL1 – espectro de emissão do Alexa 488)]. Estes experimentos revelam a expressão da proteína Ag85A pelas células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac:Ag85A, que condiz com o ensaio de Microscopia Confocal, revelado no item 6.2.2.1.

Foi também avaliada a intensidade média de fluorescência (MFI) das células submetidas às análises no citômetro de fluxo. A MFI é um parâmetro que permite relacionar a quantidade de moléculas em estudo, expressas em cada célula analisada no citômetro de fluxo. Nas análises realizadas, a MFI para células não transfectadas foi de 3,52, enquanto que a MFI para células transfectadas com o plasmídeo pValac:Ag85A foi igual a 16,00; assim, a intensidade de fluorescência das células transfectadas com pValac:Ag85A foi 3 vezes maior que a MFI das células não transfectadas (NT). A análise deste parâmetro revelou que as células transfectadas com o plasmídeo pValac:Ag85A foram capazes de expressar a proteína recombinante Ag85A em quantidades detectáveis.

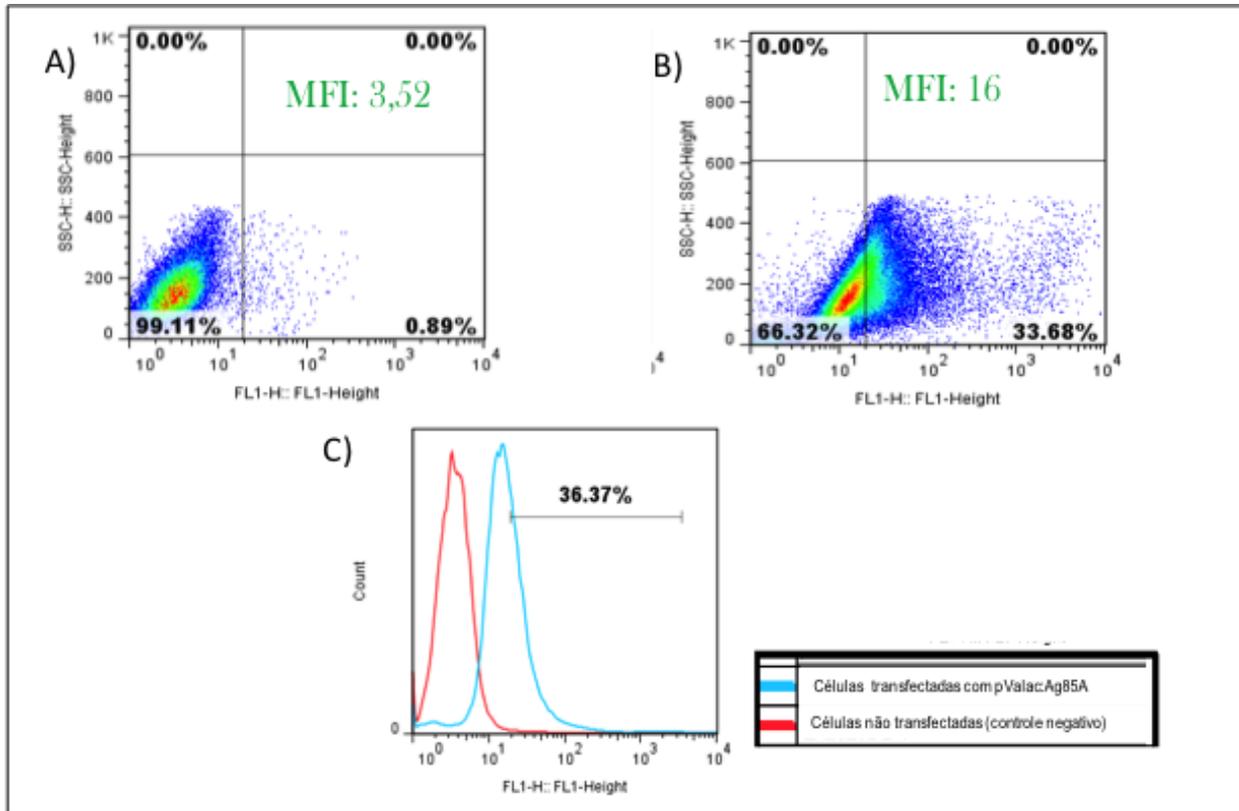


Figure 19: Verificação da produção da proteína Ag85A em células CHO por citometria de fluxo (FACS). **A)** Dot Plot evidenciando células não transfectadas marcadas com anticorpo primário e secundário; **B)** Dot Plot de células transfectadas com pValac:Ag85A marcadas com anticorpo primário e secundário. Nos gráficos dispõe-se no eixo Y a contagem celular e no eixo X o detector FL1 (laser de argônio, 488nm). Imagens obtidas utilizando-se programa FlowJo. **C)** Histograma que mostra a expressão da proteína Ag85A revelada pela marcação com anticorpo monoclonal primário (MAb) anti Ag85A, e anticorpo secundário, anti IgG de camundongo marcado com Alexa 488.

5.3 Obtenção da Linhagem Invasiva *L. lactis* FnBPA⁺ Carreando o Vetor pValac:Ag85A

5.3.1 Transformação da Linhagem Invasiva *L. lactis* FnBPA⁺ com Vetor pValac:Ag85A

Simultaneamente aos experimentos de confirmação da funcionalidade da construção pValac:Ag85A, *in vitro*, este plasmídeo, extraído do clone de *E. coli* TG1 e previamente confirmado por técnicas moleculares de PCR, digestão e sequenciamento,

foi utilizado para transformação de células eletrocompetentes de *L. lactis* FnBPA⁺, gerando a linhagem *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A).

A seleção de colônias recombinantes foi feita em placas com meio M17-Sac-Gli-Ágar, suplementado com Cm e Ery, para seleção de clones que contivessem os dois plasmídeos, pValac:Ag85A e pOri23:*fnbpa* (Que *et al.*, 2001), respectivamente. Transcorridas 20 horas de incubação, foram observadas colônias resistentes aos antibióticos mencionados, sendo que três delas foram selecionadas e todas apresentaram crescimento após inóculo em meio líquido seletivo. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de eletroporação.

Os possíveis clones foram então estocados em glicerol e submetidos à extração plasmideana. Posteriormente, os plasmídeos extraídos foram utilizados como moldes para reações de PCR, utilizando iniciadores do vetor pValac (ValF e ValR; Tabela 5) para amplificação da ORF Ag85A, bem como iniciadores fibronectina (FnBPAF e FnBPAR, Tabela 5) para a amplificação da ORF *FnBPA*. Os três DNAs plasmideanos extraídos apresentaram amplificação de ambas as sequências. Os controles negativos, aos quais foi adicionada apenas água ultrapura estéril no lugar de plasmídeo, não demonstraram quaisquer sinais de amplificação. Por conseguinte, ficou confirmada a obtenção da linhagem de *L. lactis* FnBPA⁺ portadora do plasmídeo pValac:Ag85A (Figura 20).

Cabe salientar que a ORF Ag85A apresenta-se resolvida em gel como um fragmento de 1.173 pb devido ao fato dos *primers* do vetor pValac utilizados acrescentarem 156 pb à referida ORF.

5.3.2 Transformação da Linhagem Invasiva *L. lactis* FnBPA⁺ com o Vetor pValac:*gfp*

Para ser utilizado como controle de experimentos futuros, o plasmídeo pValac:*gfp* (Guimarães *et al.*, 2009), extraído de *E. coli* TG1, também foi utilizado para transformação de células eletrocompetentes de *L. lactis* FnBPA⁺, gerando assim a linhagem de *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:*gfp*).

A seleção das colônias recombinantes foi feita em placas com meio M17-Sac-Gli-Agar suplementado com Cm e Ery, devido à presença de dois plasmídeos, o pValac:*gfp* e pOri23:*fnbpa* respectivamente. Transcorridas 20 horas de incubação, foram observadas colônias resistentes aos antibióticos mencionados, sendo que três delas foram selecionadas e todas apresentaram crescimento após inóculo em meio líquido seletivo. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de eletroporação.

Os possíveis clones foram então estocados em glicerol 80% e submetidos à extração plasmideana. Posteriormente, os plasmídeos extraídos foram utilizados como moldes para reações de PCR, utilizando iniciadores *forward* e *reverse* do vetor pValac (ValF e ValR, tabela 5) para amplificação da ORF *gfp*, bem como iniciadores para a amplificação da ORF *FnBPA* (FnBPAF e FnBPAR, Tabela 5). Os três DNAs plasmideanos extraídos apresentaram amplificação de ambas as sequências. Os controles negativos, aos quais foi adicionada apenas água ultrapura estéril no lugar de DNA plasmideano, não demonstraram quaisquer sinais de amplificação. Por conseguinte, ficou confirmada a obtenção da linhagem de *L. lactis* FnBPA⁺ portadora do plasmídeo pValac:*gfp* (Figura 20).

Do mesmo modo que para a ORF *Ag85A*, a ORF *gfp* apresenta-se resolvida em gel com um acréscimo de 156 pb, resultando em um fragmento de 852 pb.

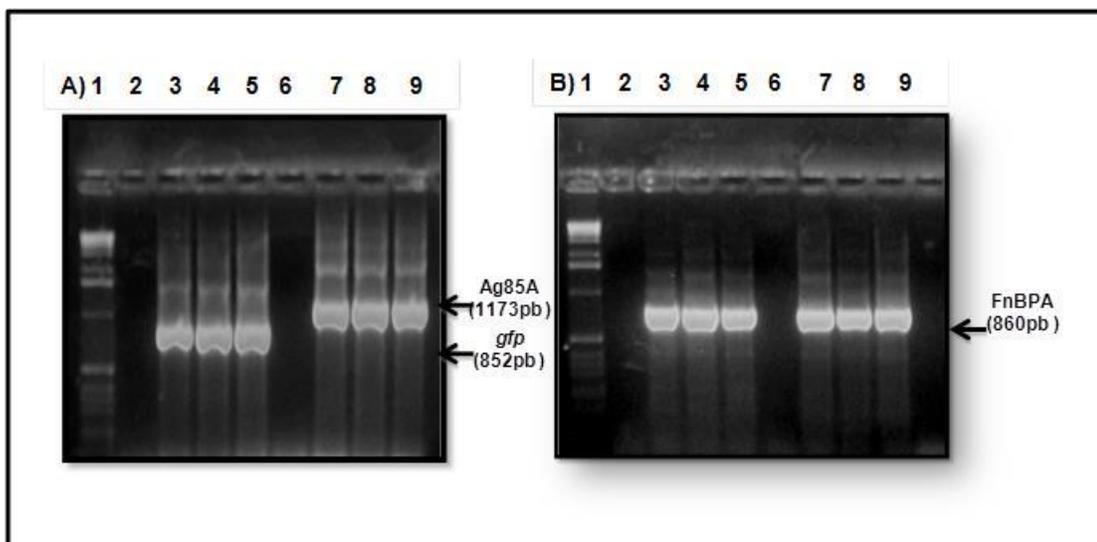


Figure 20: Confirmação da obtenção da linhagem *L. lactis* FnBPA+(pValac:Ag85A) e *L. lactis* FnBPA+(pValac:gfp). Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. **A)** Amplificação das Sequências GFP e Ag85A. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo; Canaletas 3, 4 e 5: produto de PCR a partir do DNA plasmideano da linhagem FnBPA (pValac:gfp) amplificado com *primers* ValF e ValR; Canaleta 6: Controle negativo; Canaletas 7, 8 e 9: produto de PCR a partir do DNA plasmideano da linhagem FnBPA⁺ (pValac:Ag85A) amplificado com *primers* ValF e ValR. **B)** Amplificação da ORF *FnBPA*. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo; Canaleta 3 4 e 5: produto de PCR a partir do DNA plasmideano da linhagem FnBPA⁺ (pValac:gfp) amplificado com *primers* FnBPAF e FnBPAR; Canaleta 6: Controle negativo; Canaletas 7, 8 e 9: produto de PCR a partir do DNA plasmideano da linhagem FnBPA⁺(pValac:Ag85A) amplificado com *primers* FnBPAF e FnBPAR.

Desta forma foram confirmadas a obtenção das linhagens *L. lactis* FnBPA⁺ portadora do plasmídeo pValac:Ag85A e também da linhagem *L. lactis* FnBPA⁺ portadora do plasmídeo pValac:gfp.

5.4 Padronização das Curvas de Crescimento de Diferentes Linhagens de *L. lactis* para Imunização dos Animais

Com o intuito de estabelecer a relação entre a densidade óptica (crescimento bacteriano) das linhagens em estudo com a quantidade de UFC obtidas, foi realizada uma curva de crescimento (Figura 21 A).

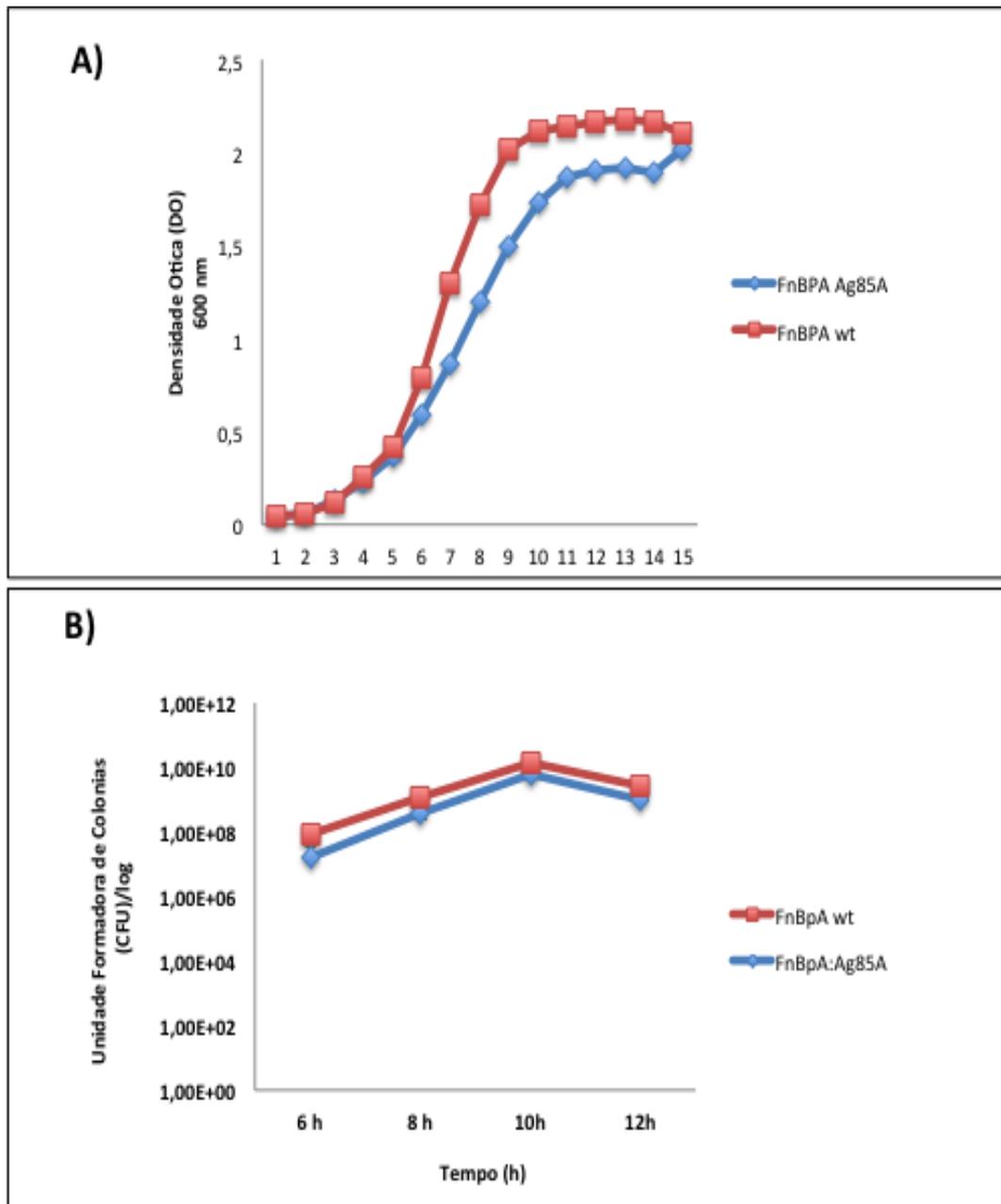


Figure 21: Curvas de crescimento de diferentes linhagens de *Lactococcus lactis*. A) Curva de crescimento das diferentes Linhagens de *L. lactis* representado no eixo da Y a densidade óptica DO_{600nm} e no eixo da X o tempo em horas. B) Curva de crescimento das diferentes Linhagens de *L. lactis* representado no eixo da Y as Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/log, e no eixo da X o tempo em horas.

Baseados nos resultados obtidos, pôde-se inferir que a quantidade de UFC estabelecidas para serem administradas aos camundongos, pela via intranasal, foi atingida as 10 horas do cultivo bacteriano, e a concentração foi de 10^9 UFC. Na figura 21 A e B, são apresentados os resultados obtidos através das curvas de crescimento.

5.5 Imunização de Camundongos C57BL/6 com as Diferentes Linhagens de *L. lactis*

Para a realização da imunização dos camundongos, foram administradas aos mesmos doses de 2×10^9 UFC a cada grupo experimental pela via intranasal. Para isto, uma dose congelada de cada grupo experimental foi plaqueada, confirmando, assim, a UFC/mL da cada linhagem representante dos grupos experimentais, sendo na ordem de 10^9 UFC/mL na DO correspondente ao último ponto da fase exponencial.

5.5.1 Caracterização do Perfil da Resposta Imune Celular

O perfil da resposta imune celular foi avaliado a partir da cultura celular dos baços dos camundongos imunizados pela via intranasal com as linhagens descritas no item 4.10.2. De esta forma, os resultados foram obtidos a partir de esplenócitos murinos estimulados durante 48 horas com a proteína recombinante Ag85A.

Todos os gráficos seguintes foram obtidos no programa *GraphPad Prism V 6.0* (GraphPad Software, San Diego California, USA), e analisados estatisticamente pelo teste de variância *One-Way ANOVA* seguido do pós teste não paramétrico *Kruskal-Wallis: Dunn's multiple comparisons test*. Os resultados estão representados no gráfico como média e erro padrão da média.

5.5.1.1. Dosagem de Citocinas INF- γ , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-4, IL-17 e IL-10 nos Esplenócitos dos Animais Imunizados

Com a finalidade de se determinar a resposta imunológica, Th1 ou Th2, gerada após a imunização dos camundongos com a linhagem *L. lactis* FnBPA⁺

(pValac:Ag85A), foi avaliada a produção das seguintes citocinas: IFN- γ , TNF- α , IL6, IL2, IL4, IL-17 e IL-10 pela técnica de citometria de fluxo (CBA- *cytometric beads array*) no sobrenadante das culturas dos esplenócitos estimulados. Para a execução dos gráficos das citocinas foi descontado o valor das mesmas do experimento das cultura de células não estimuladas, assim, o valor observado refere-se ao valor da citocina avaliada no experimento da cultura estimulada com a proteína recombinante, rAg85, menos o valor da referida citocina proveniente da cultura de células que não foi estimulada com a proteína recombinante.

A figura 22 demonstra os resultados obtidos no ensaio de CBA para a citocina IFN- γ , considerada como uma das citocinas pro-inflamatórias de maior relevância referente ao padrão Th1. Foi possível constatar diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo imunizado com a linhagem *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A) em relação aos controles negativos testados (solução salina e *L. lactis* FnBPA⁺). Como controle positivo do experimento, um grupo de camundongos C57BL/6 foi imunizado por via subcutânea com a vacina BCG; grupo este que apresenta aumento da referida citocina. Também foi avaliada a viabilidade celular. Para tanto, os esplenócitos foram estimuladas com mitógeno concavalina A (ConA). Para cada citocina avaliada, são apresentados os controles positivos, experimentais, na margem superior direita dos gráficos.

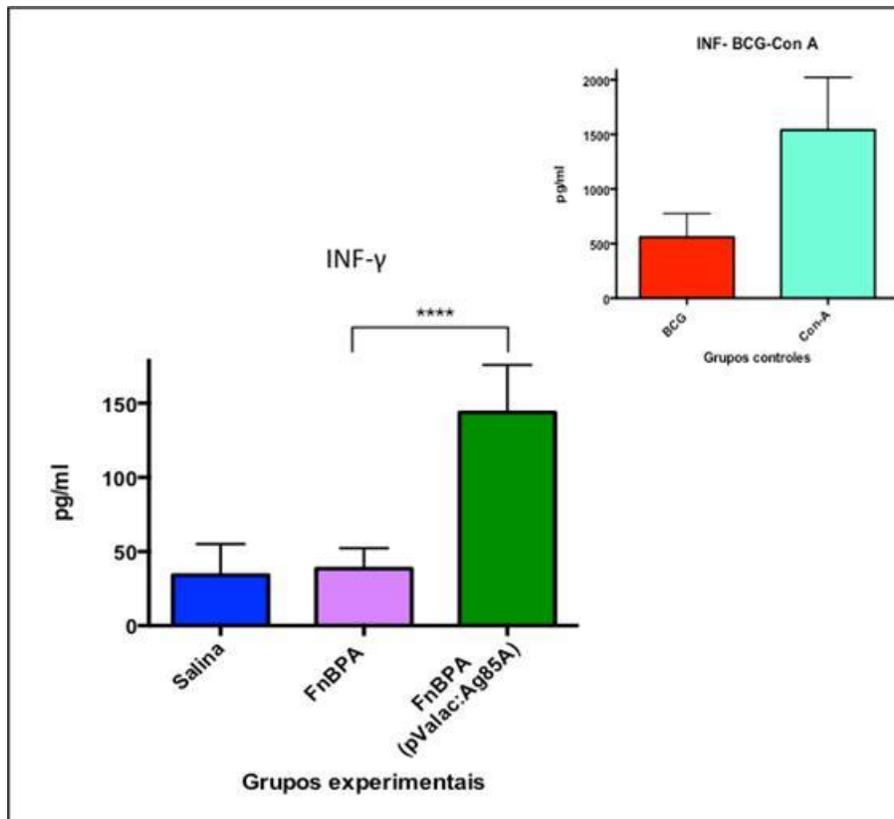


Figure 22: Produção da citocina IFN- γ em cultura de células do baço dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *L. lactis*. Resultados representados em pg/ml, com a média e desvio padrão de cada grupo de animais imunizados. Dados referentes a três experimentos independentes com 5 animais em cada grupo. Grupos experimentais: Salina, como controle negativo do experimento, *L. lactis* FnBPA⁺ e *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A). O controle positivo do experimento encontra-se na margem superior direita do gráfico, referente ao grupo de animais vacinados com a vacina BCG como também, a células dos esplenócitos estimuladas com o mitógeno Concaivalina A. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa para valores com $p < 0,05$.

Baseados nestes resultados os dados aqui obtidos condizem com outros estudos que visam a produção de resposta imune celular frente às imunizações com a proteína Ag85A. Fan e colaboradores compararam a imunogenicidade e eficácia protetora de três vacinas de DNA codificando três antígenos imunogênicos diferentes Ag85A, Ag85B e ESAT-6. Estes pesquisadores demonstraram que as três construções conseguiram induzir forte resposta imune humoral e celular em camundongos vacinados e que a melhor eficácia protetora foi conferida pela vacina que codificava a ORF Ag85A; resultado este atribuído à proliferação de linfócitos específicos e à secreção de IFN- γ (Fan, Gao e Fu, 2009). Além disso, estes resultados também

corroboram com outros obtidos utilizando-se vacinas gênicas codificando o antígeno Ag85A (Denis *et al.*,1998; Dou *et al.*,2009) que demonstram que o INF- γ possui um papel fundamental no controle de infecção por micobactérias, embora somente a produção desta citocina seja insuficiente para controlar e/ou eliminar a infecção.

Com relação à produção de TNF- α , se observa o mesmo perfil detectado para a citocina IFN- γ , ou seja, o grupo de animais imunizados com *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A) apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos controles negativos analisados. Dados apresentados na figura 23.

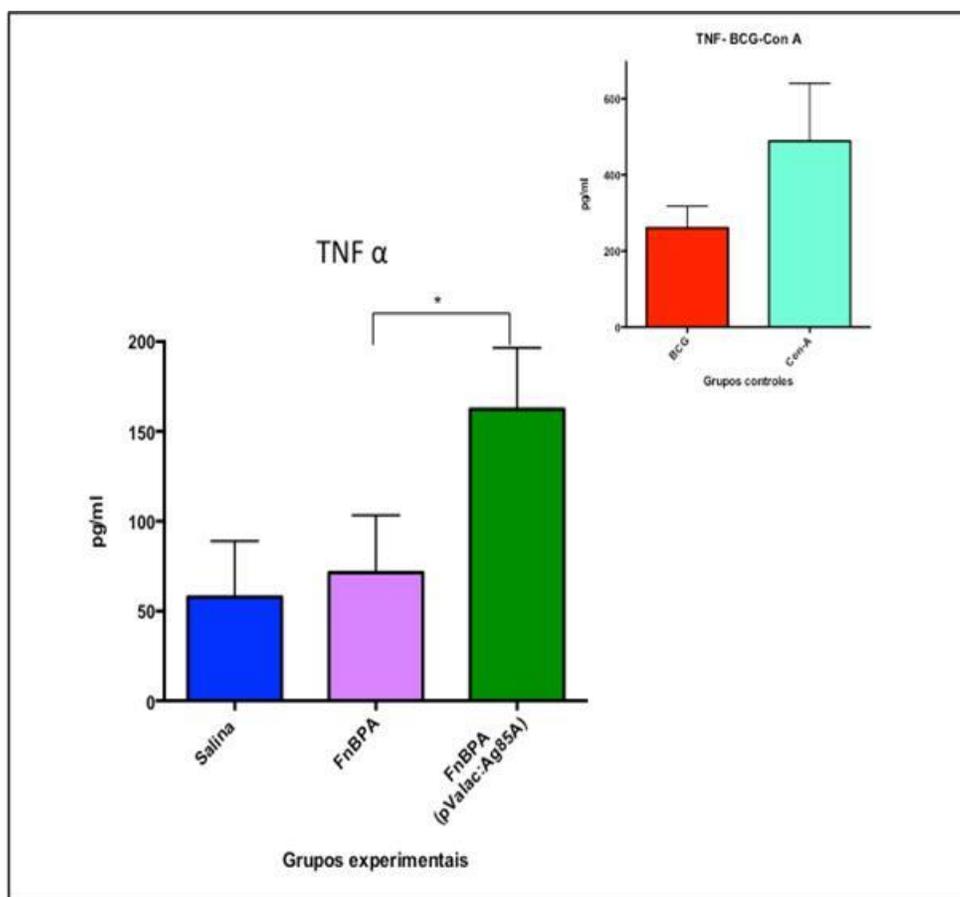


Figure 23: Produção da citocina TNF- α em cultura de células do baço dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *L. lactis*. Resultados representados em pg/ml, com a média e desvio padrão de cada grupo de animais imunizados. Dados referentes a três experimentos independentes com 5 animais em cada grupo. Grupos experimentais: Salina, como controle negativo do experimento, *L. lactis* FnBPA⁺ e *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A). O controle positivo do experimento encontra-se na margem superior direita do gráfico, referente ao grupo de animais vacinados com a vacina BCG, como também, as células dos esplenócitos estimuladas com o mitógeno Concaivalina A. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa para valores com $p < 0,05$.

TNF- α é uma citocina autócrina, secretada por células mononucleares. Esta citocina é considerada um potente ativador de monócitos e de macrófagos que possui a capacidade de atuar sinergicamente com INF- γ , possuindo assim, a capacidade de induzir uma atividade antimicrobiana via a indução de compostos intermediários reativos do oxigênio (Mootoo *et al.*, 2009). Assim sendo, o TNF- α possui um papel crucial na imunidade protetora contra infecção por TB; fato este comprovado quando

camundongos duplo *knock-out* para TNF- α (Jacobs *et al.*, 2000) e camundongos deficientes em receptores de TNF (Ehlers *et al.*, 1999) desenvolveram infecção letal por TB.

Estudos realizados com terapia anti-TNF- α revelaram reativação da TB com incidência 14 vezes maior em relação aos controles saudáveis (Tubach *et al.*, 2009; Dixon *et al.*, 2010). Estes trabalhos, junto a outros estudos que utilizam o anti-TNF- α como terapia, sugerem que a ausência da referida citocina aumenta significativamente o risco de infecções (Keystone *et al.*, 2004; van de Putte *et al.*, 2004), sendo, portanto, esta citocina de relevante importância no controle da TB.

A figura 24 demonstra os dados obtidos para a citocina pro-inflamatória IL-6. Também foi possível constatar diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo imunizado com a linhagem *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A), em relação aos controles negativos testados (solução salina e *L. lactis* FnBPA⁺).

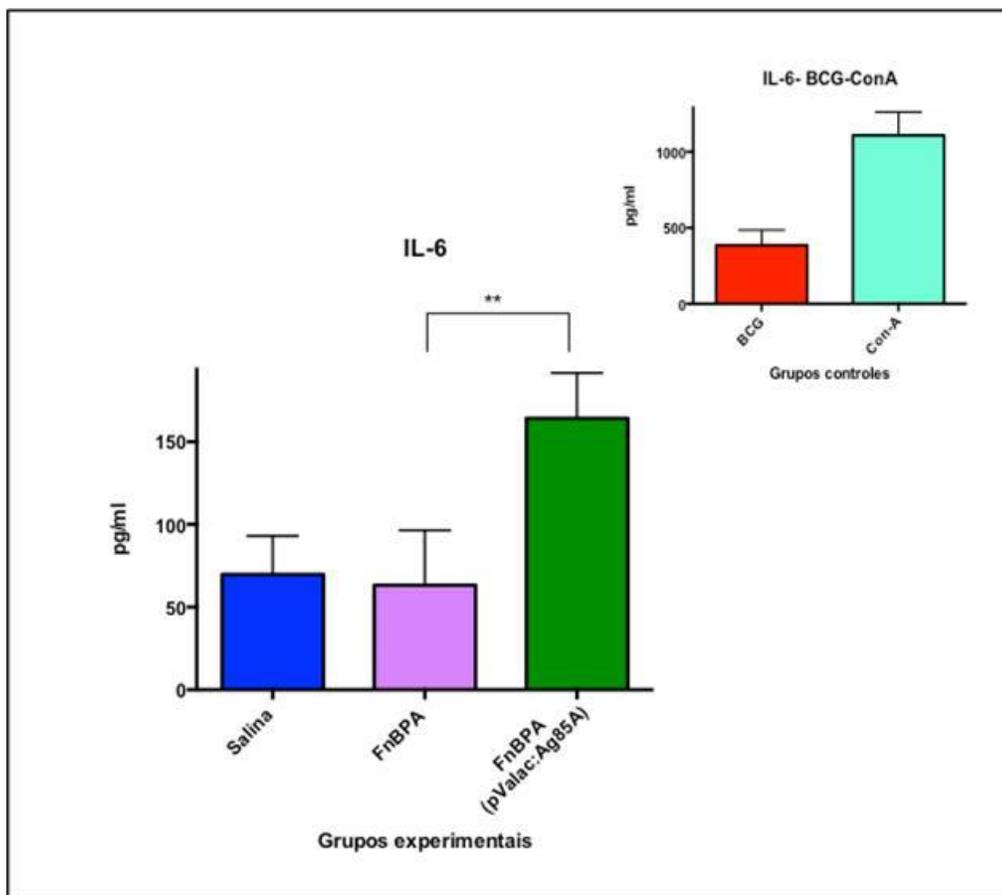


Figure 24: Produção da citocina IL-6 em cultura de células do baço dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *L.lactis*. Resultados representados em pg/ml, com a média e desvio padrão de cada grupo de animais imunizados. Dados referentes a três experimentos independentes com 5 animais em cada grupo. Grupos experimentais: Salina, como controle negativo do experimento, *L. lactis* FnBPA⁺ e *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A). O controle positivo do experimento encontra-se na margem superior direita do gráfico, referente ao grupo de animais vacinados com a vacina BCG como também, a células dos esplenócitos estimuladas com o mitógeno Conavalina A. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa para valores com $p < 0,05$.

IL-6 é uma citocina pleiotrópica produzida por uma variedade de células incluindo os macrófagos (Van Snick *et al.*, 1987), linfócitos T (Hirano *et al.*, 1985), células endoteliais (Corbel e Melchers, 1984) e fibroblastos (Weissenbach *et al.*, 1980). Esta citocina possui a capacidade de exercer seu efeito em vários tipos celulares e sua produção encontra-se aumentada na maioria das doenças inflamatórias crônicas (Martinez, Mehra e Kaushal, 2013).

Considerada uma citocina pro-inflamatória, a IL-6 é capaz de induzir a produção

de proteínas de fase aguda em resposta a infecção (Geiger *et al.*, 1988) e, assim, tem papel na manutenção e diferenciação de linfócitos B (Van Snick *et al.*, 1987; Kopf *et al.*, 1998).

Embora a infecção por *M. tuberculosis* induza a produção de IL-6, o papel de desta citocina na resposta imune contra a infecção por este patógeno ainda não é bem compreendido. Estudos *in vitro* demonstram que tanto macrófagos humanos como de camundongos secretam elevadas concentrações de IL-6 em resposta à infecção por *M. tuberculosis* (Giacomini *et al.*, 2001; Indrigo, Hunter e Actor, 2002). Estudos realizados com camundongos *knock out* para IL-6 (IL-6^{-/-}) sugerem que esta citocina possui ação fundamental nos primeiros estágios da ativação das células T (Saunders *et al.*, 2000). Além disso, esta citocina possui a capacidade de bloquear a indução de IFN- γ , promovendo a diferenciação de células CD4⁺ Th2, e inibe a diferenciação das células CD4⁺ Th1 através de dois mecanismos celulares independentes (Diehl *et al.*, 2000). Por outro lado, a IL-6 inibe a ativação dos macrófagos (Nagabhushanam *et al.*, 2003).

Tanto IL-6 quanto TNF- α são requeridos para obter uma resposta imune em camundongos infectados por *M. tuberculosis*. Porém, apesar da sua importância em mediar a inflamação, IL-6 não é essencial (assim como o TNF- α o é) para os mecanismos efetores antimicrobianos (Sodenkamp *et al.*, 2012).

Desta forma, as três citocinas até o momento estudadas, INF- γ , TNF- α e IL-6, revelam que a formulação vacinal aqui testada é capaz de polarizar uma resposta Th1, a qual é imprescindível para combater bactérias intracelulares.

Os resultados obtidos para a citocina IL-10, a qual caracteriza uma resposta anti-inflamatória, estão apresentadas na figura 25, a qual demonstra que houve um aumento significativo da produção de IL-10 (para valores com $p < 0,05$) quando comparado aos controles negativos.

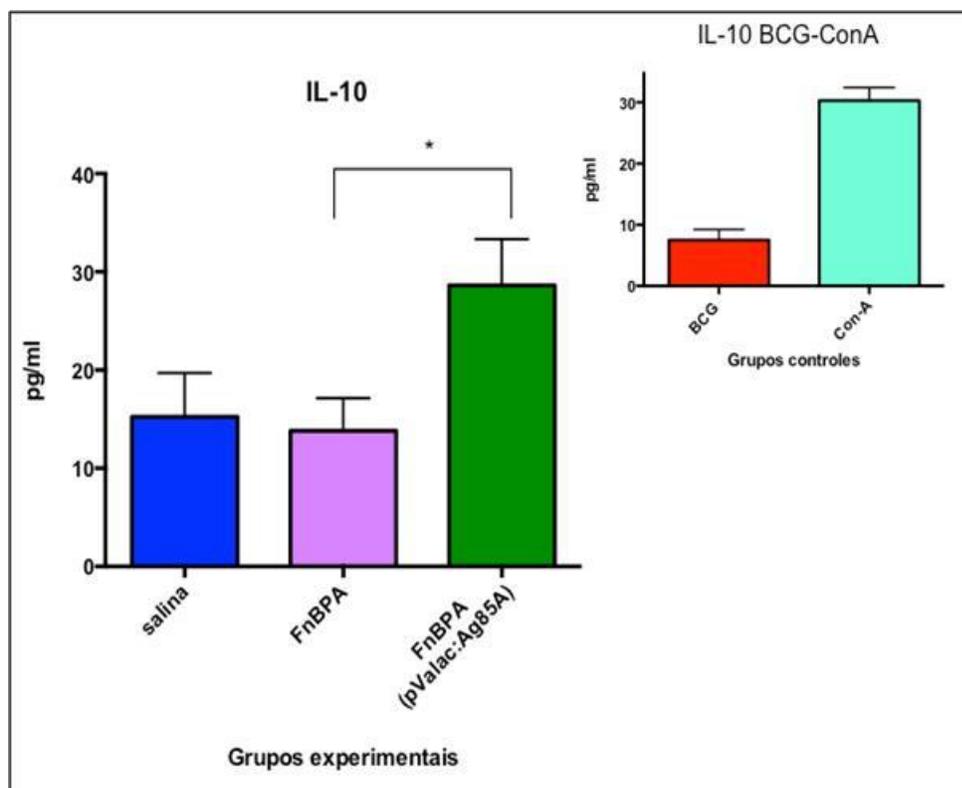


Figure 25: Produção da citocina IL-10 em cultura de células do baço dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *L. Lactis*. Resultados representados em pg/ml, com a média e desvio padrão de cada grupo de animais imunizados. Dados referentes a três experimentos independentes com 5 animais em cada grupo. Grupos experimentais: Salina, como controle negativo do experimento, *L. lactis* FnBPA⁺ e *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A). O controle positivo do experimento encontra-se na margem superior direita do gráfico, referente ao grupo de animais vacinados com a vacina BCG como também, a células dos esplenócitos estimuladas com o mitógeno Concavalina A. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa para valores com $p < 0,05$.

IL-10 é uma citocina produzida por macrófagos, células dendríticas (Li, Corraliza, e Langhorne, 1999), célula B e por diferentes subtipos de células T CD4⁺ e CD8⁺ (Moore *et al.*, 2001; Kamanaka *et al.*, 2006). Esta citocina possui a capacidade de regular a resposta de células T e de células NK de forma indireta, através da inibição da sua proliferação e da produção de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, como também de TNF- α (Schandene *et al.*, 1994; Joss *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2001).

Entretanto, sobre os monócitos e macrófagos, a referida citocina possui um efeito direto dado pela inibição da expressão das moléculas MHC de classe II, desta forma, limitando a produção de citocinas pro-inflamatórias (Moore *et al.*, 2001).

IL-10 pode regular diretamente tanto a resposta inata como a resposta adaptativa Th1, Th2 ou Th17 através da ativação limitada e da diferenciação de células T nos linfonodos, como também pela supressão da resposta pro-inflamatória nos tecidos, causados pela resposta imune adaptativa exacerbada (Ouyang *et al.*, 2011); situação esta que leva a um controle diminuído do patógeno como, também, da imunopatologia (Couper *et al.*, 2008).

Estudos *in vivo* demonstraram que a IL-10 é um citocina crítica na proteção do hospedeiro contra os danos gerados pela inflamação (Howard *et al.*, 1993). A produção de IL-10 representa um potente *feedback* auto-regulatório que protege o organismo do hospedeiro contra uma inflamação excessiva e potencial destruição tecidual durante resposta imune pro-inflamatória de padrão Th1 (Gabrysova *et al.*, 2009).

O papel da IL-10, na infecção por *M. tuberculosis*, continua controverso. Um estudo realizado com o intuito de se identificar os fatores que geram necrose em granulomas descreve que a ausência de IL-10 acelera a formação de focos necróticos nos mesmos (Ehlers *et al.*, 2001), o que pode ser devido ao aumento na produção do IFN- γ (Ehlers e Daffe, 1998).

Acredita-se que nos primeiros estágios da infecção por *M. tuberculosis* a presença de IL-10 se deva à eliminação limitada do patógeno devido a seu efeito inibitório sobre ativação de macrófagos e células dendríticas (Redford, Murray e O'Garra 2011), incluindo a via de inibição de fusão fagossoma-lisosoma (O'Leary *et al.*, 2011). A fonte celular de indução e produção da IL-10 durante a infecção com *M. tuberculosis* é dinâmica e provavelmente depende de alguns fatores tais como o estágio da infecção, a localização anatômica da doença e do patógeno específico. A produção de IL-10 nos primeiros estágios da infecção se deve às células mielóides tais como macrófagos, sendo que com o desenvolvimento da resposta adaptativa, as células T tornam-se produtoras da referida citocina. Contudo, em uma infecção crônica, quando há níveis de IL-10 detectáveis, sugere-se que esta citocina possui a função de limitar a imunopatologia mediada pelo hospedeiro devido às exacerbadas respostas efetoras. Neste contexto, estima-se que as linhagens de *M. tuberculosis* aproveitam os efeitos supressores naturais da IL-10 para criar nichos no interior dos macrófagos ativado (Redford, Murray e O'Garra 2011).

Assim, os resultados aqui obtidos, no que se refere à produção da citocina IL-10, demonstraram que a formulação vacinal aqui testada induziu a produção da mesma no sobrenadante de cultura de células do baço dos animais imunizados, após estímulo com a proteína recombinante rAg85A. Assim sendo, o resultado obtido neste trabalho estaria de acordo com a teoria que estabelece que a IL-10 tem emergido como um imuno-regulador chave capaz de melhorar as respostas exacerbadas do tipo Th1 e responsáveis em grande parte, pela imunopatologia que ocorre durante certas infecções (Couper *et al.*, 2008).

Com relação às citocinas IL-2, IL-4 e IL-17, não foi possível detectar valores significativos no sobrenadante das culturas de esplenócitos estimulados com a proteína recombinante rAg85A.

Também foi avaliada a produção das citocinas INF- γ , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-4, IL-17 e IL-10 presentes no lavado broncoalveolar dos animais imunizados com as diferentes linhagens recombinantes, porém não foi possível detectar nenhuma das citocinas no referido material biológico.

5.5.2 Caracterização do Perfil da Resposta Imune Humoral dos Animais Imunizados

Para o estudo da resposta imune humoral sistêmica foi avaliado o perfil de Imunoglobulinas (IgA, IgG e seus isotipo IgG1) no soro do sangue coletado 15 dias após a última imunização dos camundongos. Já para avaliar a resposta imune humoral das mucosas foi avaliado o perfil da IgA secretora no lavado broncoalveolar dos animais imunizados. Todos os gráficos seguintes foram obtidos no programa GraphPad Prism V 6.0 (GraphPad Software, San Diego California, USA) e analisados estatisticamente pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido do pós teste não paramétrico Kruskal-Wallis: Dunn's multiple comparisons test. Os resultados estão representados no gráfico como média e erro padrão da média.

5.5.2.1 Avaliação da Resposta Imune Humoral Sistêmica.

A resposta imune humoral foi avaliada através da técnica de ELISA, que permitiu analisar a resposta dos anticorpos IgA, IgG e seu isotipo IgG1, específicos contra Ag85A. Como controle negativo foram utilizadas amostras do soro dos animais pré-imunizados análises estas, realizadas com o intuito de avaliar a presença ou ausência de uma resposta imune sistêmica após a imunização dos camundongos com as linhagens recombinantes de *L. lactis*.

A análise das imunoglobulinas após 15 dias da última imunização com as linhagens recombinantes de *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A), apresentou produção de anticorpos específicos tanto para IgG (Figura 26) quanto para IgG1 (Figura 27). Neste ensaio para ambas as imunoglobulinas não foi possível constatar diferença significativa nos níveis de anticorpos entre o grupo em estudo *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A) e o grupo *L. lactis* FnBPA⁺.

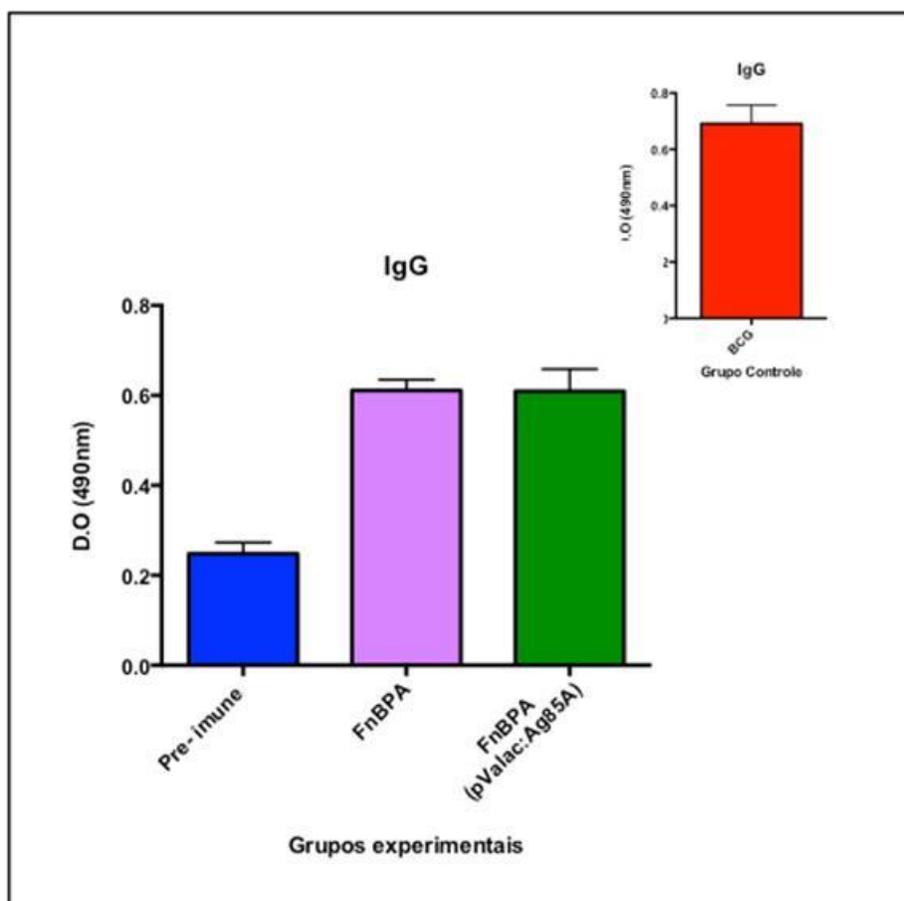


Figure 26: Determinação da produção de anticorpos IgG anti-Ag85A. Resultados apresentados com valores da media e desvio padrão de cada grupo de animais imunizados. Dados referentes a media de três experimentos independentes com cinco animais em cada grupo. Os níveis de anticorpos presentes no soro dos animais foram detectados pela técnica de ELISA (dil 1/25). Grupos experimentais: Animais antes de serem imunizados (pré-imune) como controle negativo do experimento, *L. lactis* FnBPA⁺e *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A). O controle positivo do experimento encontra-se na margem superior direita do gráfico, referente ao grupo de animais vacinados com a vacina BCG. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa para valores com $p < 0,05$.

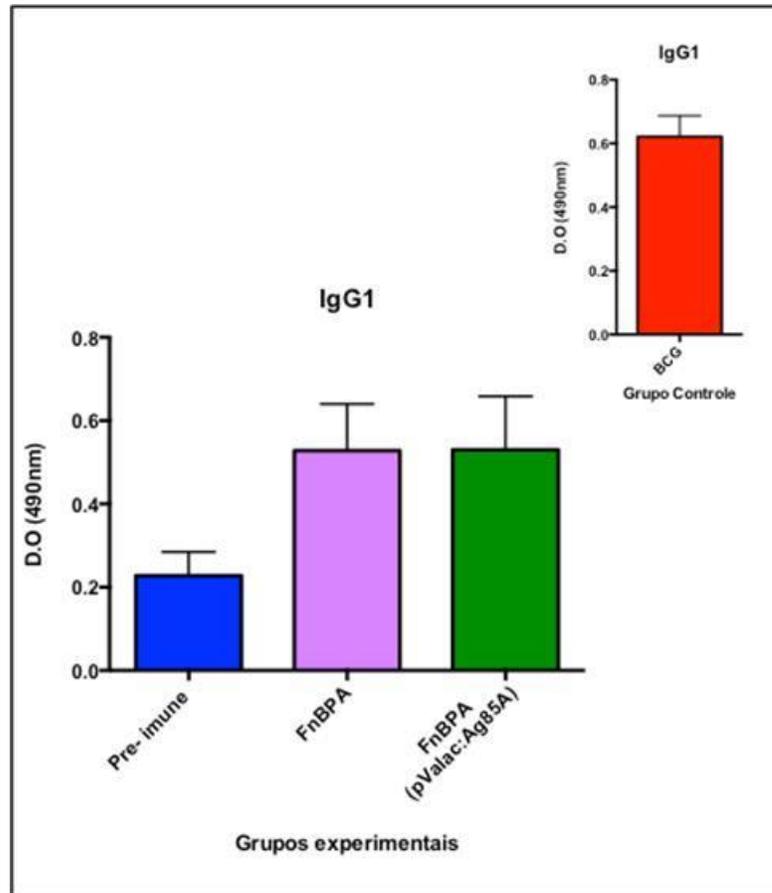


Figure 27: Determinação da produção de anticorpos IgG1 anti-Ag85A. Resultados apresentados com valores da média e desvio padrão de cada grupo de animais imunizados. Dados referentes a média de três experimentos independentes com cinco animais em cada grupo. Os níveis de anticorpos presentes no soro dos animais foram detectados pela técnica de (dil 1/25). Grupos experimentais: Animais antes de serem imunizados (pré-imune) como controle negativo do experimento, *L. lactis* FnBPA⁺ e *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A). O controle positivo do experimento encontra-se na margem superior direita do gráfico, referente ao grupo de animais vacinados com a vacina BCG. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa para valores com $p < 0,05$.

Embora a resposta imune Th1 proteja o hospedeiro contra patógenos intracelulares e a resposta imune Th2, contra patógenos extracelulares, muitos candidatos vacinais que estão sendo considerados induzem ambas as respostas imunes (Abebe e Bjune, 2009). A eficácia protetora de respostas mistas tem sido demonstrada por infecções de *Chlamydia*, *Plasmodium*, *Cryptococcus neoformans* e *Schistosoma* (Igietsme *et al.*, 2004; Moore e Hutchings, 2007; McManus e Loukas, 2008). Dada a importância dos anticorpos no desenvolvimento de uma nova

formulação vacinal, pesquisou-se aqui a produção de anticorpos específicos, os quais seriam um indicador importante de resposta humoral gerada pela linhagem em estudo.

Os anticorpos produzidos pelo sistema imune do hospedeiro durante um processo infeccioso inibem a replicação do patógeno, neutralizam toxinas produzidas pelos mesmos, promovem citotoxicidade dependente de células (ADCC) e servem como opsoninas além de ativar a cascata do complemento (Igiertseme *et al.*, 2003; Relijic e Ivanyi, 2006). Embora a produção de anticorpos não seja um fator preponderante no controle da resposta imune contra a TB, não se pode descartar totalmente sua participação na imunidade protetora.

A opsonização é o mecanismo mais relevante no combate à disseminação do patógeno pós infecção por *M. tuberculosis* (Abebe e Bjune, 2009). Estudos relatam aumento da internalização e da morte das micobactérias por neutrófilos e macrófagos na presença de anticorpos (Brown *et al.*, 2003; de Valliere *et al.*, 2005). Também há evidências contundentes de que as micobactérias revestidas de anticorpos específicos são processadas e apresentados de forma mais eficaz pelas DCs para a estimulação de células T CD4⁺ e CD8⁺ (Teitelbaum *et al.*, 1998; Pethe *et al.*, 2001; Chambers, Gavier-Widen, Hewinson, 2004).

Assim, a imunização com *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A) não apresenta diferenças estatisticamente significativas em relação à determinação de anticorpos específicos anti-Ag85A IgG e IgG1, quando comparada com as linhagens controles.

A figura 28 representa a produção de anticorpos IgA anti Ag85A. Os resultados apresentados mostram que o grupo de animais imunizados com *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A) foi capaz de produzir valores significativos de IgA sérica quando comparado aos controles testados.

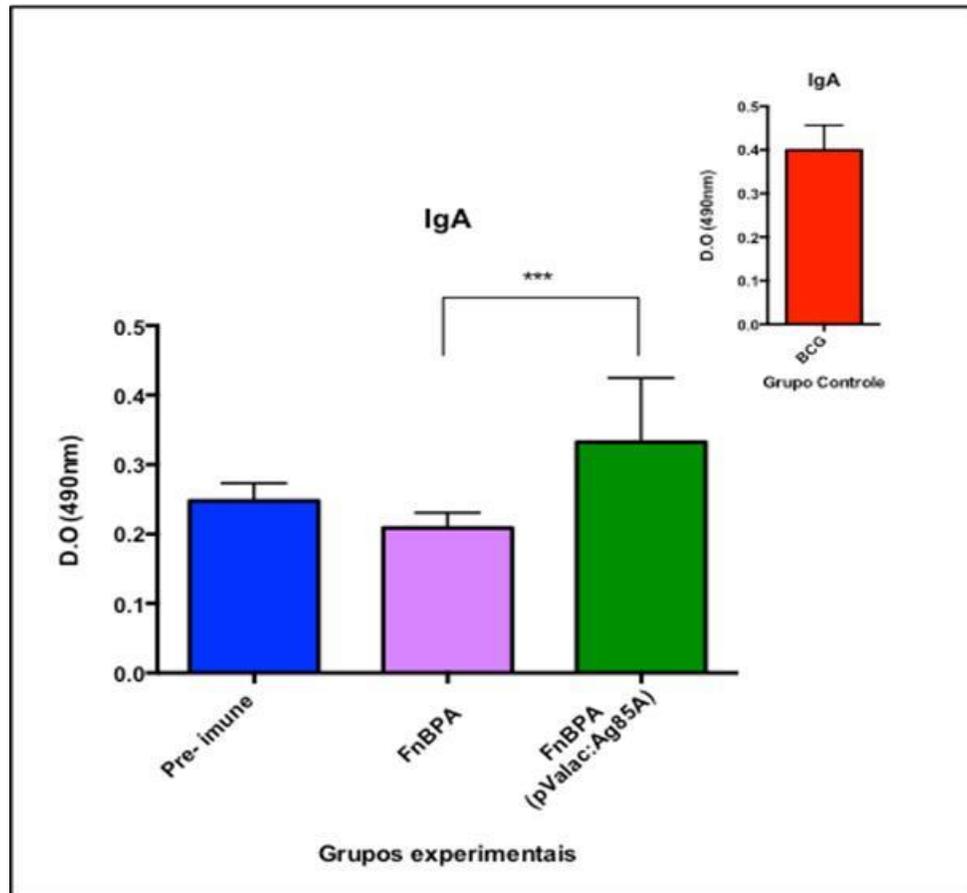


Figure 28: Determinação da produção de anticorpos IgA anti-Ag85A. Resultados apresentados com valores da média e desvio padrão de cada grupo de animais imunizados. Dados referentes a média de três experimentos independentes com cinco animais em cada grupo. Os níveis de anticorpos presentes no soro dos animais foram detectados pela técnica de ELISA (dil 1/25). Leitura foi realizada a 492 nm. Grupos experimentais: Animais antes de serem imunizados (pré-imune) como controle negativo do experimento, *L. lactis* FnBPA⁺ e *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A). O controle positivo do experimento encontra-se na margem superior direita do gráfico, referente ao grupo de animais vacinados com a vacina BCG. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa para valores com $p < 0,05$.

Estes resultados de IgA junto aos resultados obtidos para IgG e IgG1, sugerem que a imunização intranasal foi capaz de gerar também resposta imune em nível sistêmico.

5.5.2.2. Avaliação da Resposta Imune Humoral Gerada nas Mucosas

Com o intuito de avaliar a resposta imune humoral gerada nas mucosas dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *L. lactis* pela via intranasal,

procedeu-se à avaliação do perfil de IgA secretora e de IgG no lavado broncoalveolar dos camundongos imunizados.

A figura 29 demonstra a produção de anticorpos IgG anti-Ag85A. Os resultados apresentados mostram que o grupo de animais imunizados com *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A) foi capaz de produzir valores significativos de IgG quando comparado aos controles testados.

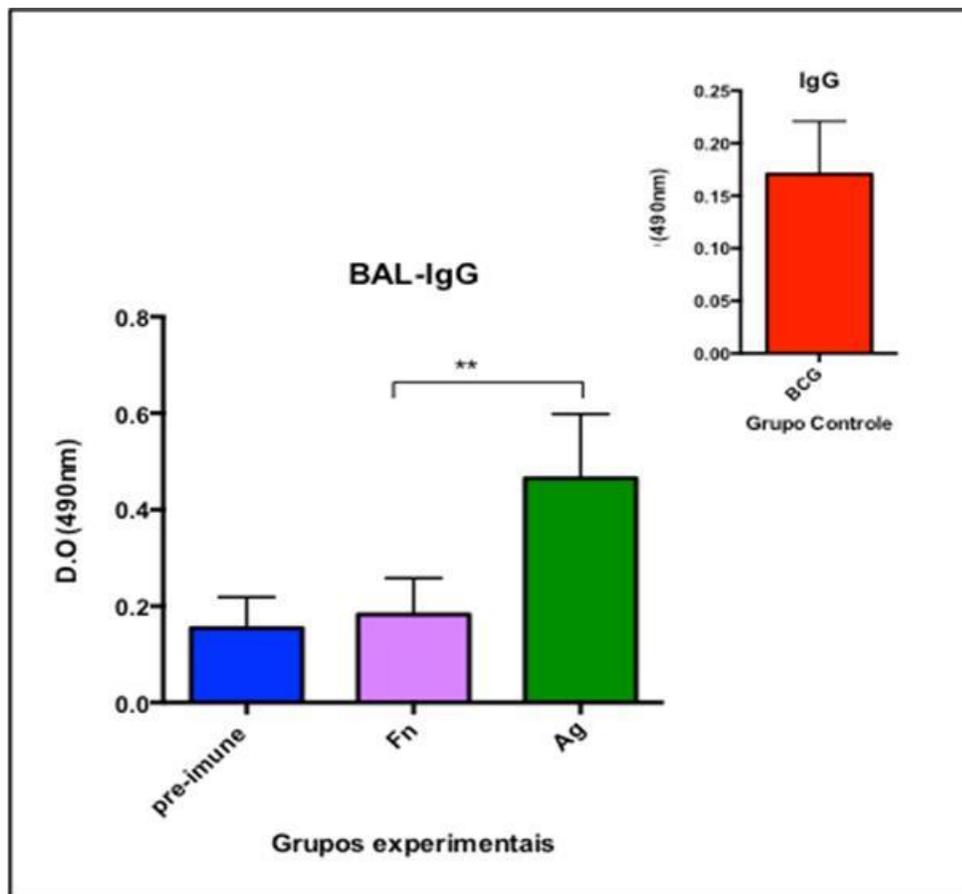


Figure 29: Determinação da produção de anticorpos IgG anti-Ag85A. Resultados apresentados com valor da média e desvio padrão de cada grupo de animais imunizados. Dados referentes a média de três experimentos independentes com cinco animais em cada grupo. Os níveis de anticorpos foram detectados por ELISA na lavagem broncoalveolar dos animais. Grupos experimentais: Animais antes de serem imunizados (pré-imune) como controle negativo do experimento, *L. lactis* FnBPA⁺ e *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A). O controle positivo do experimento encontra-se na margem superior direita do gráfico, referente ao grupo de animais vacinados com a vacina BCG. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa para valores com $p < 0,05$.

A IgG é considerado um anticorpo importante para a defesa contra infecções respiratórias. Este anticorpo promove a fagocitose dos patógenos, impedindo, assim, a disseminação local e também a passagem dos mesmos para a corrente sanguínea (Twigg, 2005). Um estudo demonstrou a produção de IgG após infecção ou vacinação das mucosas (Moldoveanu *et al.*,1995), constatando que essa situação contribui para a neutralização dos patógenos.

Com relação à produção de anticorpos específicos IgA secretora anti-Ag85A (Figura 30), foi observado um aumento significativo no lavado broncoalveolar dos animais imunizados com e *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A), quando comparado ao grupo imunizado com *L. lactis* FnBPA⁺.

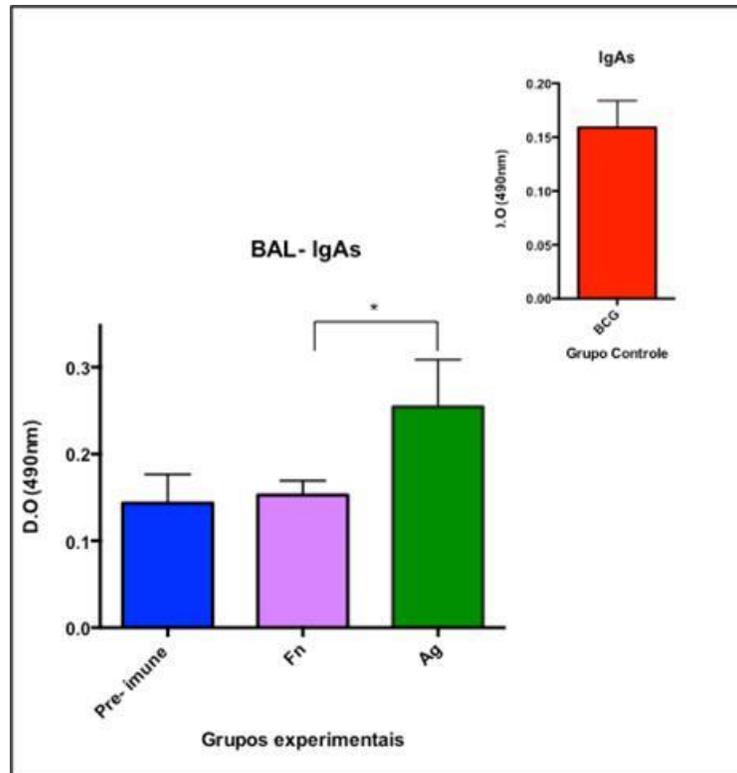


Figure 30: Determinação da produção de anticorpos IgA anti-Ag85A. Resultados apresentados com valores da média e desvio padrão de cada grupo de animais imunizados. Dados referentes a média de três experimentos independentes com cinco animais em cada grupo. Os níveis de anticorpos presentes no lavado broncoalveolar dos animais foram detectados pela técnica de ELISA. Grupos experimentais: Animais antes de serem imunizados (pré-imune) como controle negativo do experimento, *L. lactis* FnBPA⁺ e *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A). O controle positivo do experimento encontra-se na margem superior direita do gráfico, referente ao grupo de animais vacinados com a vacina BCG. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa para valores com $p < 0,05$.

A imunidade de mucosas é mediada principalmente pela sIgA que, ao contrário de outros isotipos de imunoglobulinas, são resistentes à degradação por proteases. Dentre as funções desta imunoglobulina, destaca-se a captura de antígenos e microrganismos pelo muco, com a conseqüente inibição da colonização das mucosas por patógenos. A sIgA também tem a capacidade de capturar antígenos dentro do epitélio secretor, quando o mesmo encontra-se infectado, sem gerar dano aos tecidos (Hutchings *et al.*, 2004; Brandtzaeg, 2007). Estudos revelam que a administração passiva via intranasal de IgA específica promove proteção contra o desafio com *M. tuberculosis*, sendo que camundongos *knock out* para IgA (IgA^{-/-}) foram mais

susceptíveis à infecção por esta bactéria, fato comprovado pela alta carga bacteriana encontrada no pulmão destes animais (Williams *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2005). Desta forma, tanto a sIgA como a IgG específicas são respostas desejáveis na imunidade protetora induzida por vacinação.

Assim, os resultados aqui obtidos demonstram que a vacinação intranasal induziu níveis estatisticamente significativos de IgA e de IgG na mucosa respiratória e também em nível sistêmico. Os níveis de sIgA no BAL após imunização intranasal são consistentes com a idéia de que a vacinação por esta via possui, como alvo, o tecido linfóide associado às mucosas, no intuito de gerar resposta imune local (Kiyono *et al.*, 1992).

Para se investigar a imunidade das mucosas foi utilizado como material biológico a lavagem broncoalveolar (BAL) dos animais imunizados. Assim, sendo, o estudo das citocinas, IL-4, IL-10, IL-2, TNF- α e IFN- γ , não revelou valores detectáveis.

7. CONCLUSÕES

Os resultados aqui obtidos e apresentados nos permitem concluir que:

1. A clonagem da ORF *Ag85A* de *M. tuberculosis* no vetor pValac e a posterior transformação em *Lactococcus lactis*, demonstrou um vetor de entrega de antígeno eficiente após de levar à expressão do gene de interesse em células hospedeiras.
2. A imunização com o vetor *L.lactis* contendo o plasmideo pValac:*Ag85A* foi capaz de ativar a resposta imune do hospedeiro, levando a produção sistêmica de INF- γ , TNF- α , IL-6.
3. Para a resposta imune de mucosas ao nível do trato respiratório, foi possível a detecção dos anticorpos sIgA e IgG no grupo de animais imunizados com a linhagem FnBPA⁺ (pValac:*Ag85A*), o que sugere o desenvolvimento de resposta imune local.
4. Para a resposta imune sistêmica também foi possível a detecção da produção dos anticorpos IgG e IgA em nível sistêmico.

Em suma, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram o potencial vacinal de *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:*Ag85A*), onde após os ensaios de imunização intranasal de camundongos C57BL/6, foi possível observar um perfil de citocinas pro-inflamatórias de grande relevância no que se refere a uma resposta imune gerada para combater bactérias intracelulares, como é o caso de *M. tuberculosis*. Em relação à produção de imunoglobulinas, também foi observado um perfil de resposta com polarização para resposta imune do padrão Th1. Assim, o trabalho aqui apresentado se coloca como um estudo pioneiro e de referência no que se refere à utilização de bactérias lácticas recombinantes como veículos carreadores de vacinas gênicas contra a TB.

8. PERSPECTIVAS

8.1 Perspectivas

O vector vacinal pValac:Ag85A, construído no presente trabalho, mostrou-se funcional em células eucarióticas, tendo sido possível a visualização da expressão da proteína imunogênica Ag85A nos testes realizados. Após a construção e caracterização deste plasmídeo, buscou-se a obtenção da linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A) com o intuito de utilizá-la nos experimentos de imunização em camundongos. Assim, estamos frente a um sistema funcional de entrega de plasmídeos capaz de gerar resposta imune humoral e celular em camundongos imunizados.

Neste contexto, as perspectivas para a continuidade deste projeto são:

- Avaliar outras vias de imunização como, por exemplo, a via oral.
- Com o intuito de aumentar a imunogenicidade da formulação vacinal aqui desenvolvida [*L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A)] propõe-se um esquema de imunização *priming-boosting*, no qual camundongos primeiramente vacinados com uma dose da vacina licenciada, BCG intradérmica, receberão o reforço com a linhagem *L. lactis* FnBPA⁺ (pValac:Ag85A).
- Por fim, experimentos de desafio com o patógeno, com o intuito de avaliar o nível da proteção conferida, seja só pela vacina gênica ou pelo regime *priming-boosting* deverão ser realizados. O desafio também permitirá responder qual via de administração de mucosas (intranasal ou oral) será a mais eficaz na proteção contra *M. tuberculosis* com o esquema proposto.

Assim, com a finalização deste projeto, espera-se que a eficácia e efetividade de novas formulações vacinais baseadas em bactérias lácticas invasivas, por via de administração em mucosas, seja comprovada. Com isto, este sistema vacinal poderá ser utilizado para a pesquisa e o desenvolvimento de outras vacinas gênicas contra demais patógenos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abebe, F., Bjune, G. (2009) The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. Clin Exp Immunol. (2):235-43.

Abou-Zeid, C.; Smith, I.; Grange, J.M.; Ratliff, T.L.; Steele, J.; Rook, G.A. (1988) The secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their relationship to those recognized by the available antibodies. J Gen Microbiol 134: 531-538.

Ahsan, M.F. and Gore, M.M. (2011) Comparative analysis of macrophage associated vectors for use in genetic vaccine. Genet Vaccines Ther. 9:10.

Alam, M. M, Riyadh, M.A., Fatema, K., Rahman, M.A., Akhtar, N., Ahmed, T., Chowdhury, M.I., Chowdhury, F., Calderwood, S.B., Harris, J.B., Ryan, E.T., Qadri, F. (2011) Antigen-specific memory B-cell responses in Bangladeshi adults after one- or two-dose oral killed cholera vaccination and comparison with responses in patients with naturally acquired cholera. Clin. Vaccine Immunol. 18, 844–850

Almeida, A.J., Alpar, H.O. (1996) Nasal delivery of vaccines. J Drug Target.; 3 (6):455-67.

Andersen, P.; Askgaard, D.; Ljungqvist, L.; 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.

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.

Anuradha, B., Santosh, C.M., Hari Sai Priya, V., Suman Latha, G., Murthy, K.J., Vijaya Lakshmi, V. (2007) Age-related waning of in vitro Interferon-gamma levels against r32kDaBCG in BCG vaccinated children. J Immune Based Ther Vaccines.7;5:8.

Atanasiu, P.; Orth, G.; Dragonas P. (1962) Delayed specific antitumoral resistance in the hamster immunized shortly after birth with the polyoma virus. C R Hebd Seances Acad Sci; 254:2250-2.

Autenrieth, S.E. and Autenrieth, I.B. (2008) *Yersinia enterocolitica*: subversion of adaptive immunity and implications for vaccine development. Int J Med Microbiol; 298:69-77.

Azevedo, V. e 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.).

Azizi MH. (2010) A brief history of smallpox eradication in Iran. Arch Iran Med.13,69-73.

Badger, C.V.; Richardson J.D.; DaSilva, R.L.; Richards, M.J.; Josleyn, M.D.; Dupuy, L.C.; Hooper, J.W. ; Schmaljohn C.S. (2011) Development and application of a flow cytometric potency assay for DNA vaccines. Vaccine. 29: 6728-6735.

Bacal, N.S.; Faulhaber, M.H.W. (2003). Introdução à Citometria de Fluxo, cap.1 In: *Aplicação prática em Citometria de Fluxo*. São Paulo: Editora Atheneu.

Bagarazzi, M.L.; Boyer, J.D.; Javadian, M.A.; Chattergoon, M.; Dang, K.; Kim, G.; Shah, J.; Wang, B.; Weiner, D.B. (1997) Safety and immunogenicity of intramuscular and intravaginal delivery of HIV-1 DNA constructs to infant chimpanzees. J. Med. Primatol.1-2,:27-33.

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

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.

Belisle, J.T; Vissa, V.D.; Sievert,T.; Takayama, K.; Brennan,P.J.; Besra, G.S. (1997) Role of the Major Antigen of Mycobacterium tuberculosis in Cell Wall Biogenesis. Science 30;276 (5317):1420-2.

Benihoud, K.; Yeh, P.; Perricaudet, M. (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. Curr. Opin. Biotechnol. 10, 440–447.

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.

Bertho, A.L. (2007). *Citometria de fluxo*. Apostila Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Disponível em <<http://picf.ioc.fiocruz.br/>>

Bienenstock, J., McDermott, M.R., Clancy, R.L. (1999) Respiratory tract defenses: role of mucosal lymphoid tissues, in: P.L. Ogra, M.E. Lamm, J. Bienenstock, J. Mestecky, W. Strober, J.R. McGhee (Eds.), 2nd Edition, *Mucosal Immunology*, Academic Press, London, pp. 283–292.

Bivas-Benita, M.; van Meijgaarden, K.E.; Franken, K.L.; Junginger, H.E.; Borchard, G.; Ottenhoff, T.H.; and Geluk, A. (2004) Pulmonary delivery of chitosan-DNA nanoparticles enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding HLA-A*0201-restricted T-cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 22: 1609-1615.

Black, K.P., Cummins, J.E. Jr, Jackson, S. (1996). Serum and secretory IgA from HIV-infected individuals mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity *Clin Immunol Immunopathol.* (2):182-90

Blaschitz, C. & Raffatellu, M. (2010) Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *J. Clin. Immunol.* **30**, 196–203

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.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J. C. (1997) Cellular response to interferon- γ *Annual Review Immunology* 15: 749-795.

Bolotin, A.; Wincker, P.; Mauger, S.; Jaillon, O.; Malarme, 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.

Boyaka, P.N., Tafaro, A., Fischer, R., Fujihashi, K., Jirillo, E., McGhee, J.R., (2003) Therapeutic manipulation of the immune system: enhancement of innate and adaptive mucosal immunity. *Curr Pharm* 9(24):1965-72.

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.

Brandtzaeg, P. (2007) Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 25, 5467–5484

Brandtzaeg, P. (2010) Homeostatic impact of indigenous microbiota and secretory immunity *Benef Microbes*. 1(3):211-27

Brandtzaeg, P. (2011) Potential of nasopharynx-associated lymphoid tissue for vaccine responses in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 183, 1595–1604

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.

Brookes, R.H.; Hill P.C.; Owiafe P.K.; Ibang H.B.; Jeffries, D.J.; Donkor, S.A.; Fletcher, H.A.; Hammond, A.S.; Lienhardt, C.; Adegbola, R.A.; McShane, H.; Hill, A.V.S.(2008) Safety and immunogenicity of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in West Africa. *PLoS One* 3: e 2921

Brooks, J.V., Frank, A.A., Keen, M.A., Bellisle, J.T., Orme, I.M. (2001) Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect Immun*. (4):2714-7.

Brown, R.M., Cruz, O., Brennan, M., Gennaro, M.L., Schlesinger, L., Skeiky, Y.A., Hoft, D.F. (2003) Lipoarabinomannan-reactive human secretory immunoglobulin response induced by mucosal bacilli Calmette–Guerin vaccination. *J Infect Dis* 187:513–7.

Brun, P.; Zumbo, A.; Castagliuolo, I.; Delogu, G.; Manfrin, F.; Sali, M.; Fadda, G.; Grillot-Courvalin, C.; Palu, G.; Manganelli, R. (2008) Intranasal delivery of DNA encoding antigens of *Mycobacterium tuberculosis* by non-pathogenic invasive *Escherichia coli*. *Vaccine*; 26:1934-41.

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

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.

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.

Carr, F.J.; Chill, D.; Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4): 281–370.

Chambers, M.A., Gavier-Widen, D., Hewinson, R.G. (2004) Antibody bound to the surface antigen MPB83 of *Mycobacterium bovis* enhances survival against high dose and low dose challenge. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41:93–100.

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 Ther*. 15(16): 1184-1190.

Cho, S.; Mehra, V.; Thoma-Uszynski, S.; Stenger, S.; Serbina, N.; Mazzaccaro, R.J.; Flynn, J.L.; Barnes, P.F.; Southwood, S.; Celis, E.; Bloom, B.R.; Modlin, R.L.; Sette, A. (2000) Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12210-12215.

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.

Christensen, H.R.; Frøkiaer, H.; Pestka, J.J. (2002) Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol.*;168:171-8.

Co, D., Hogan, L.H., Kim, S.I., Sandor, M. (2004) Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol Nov*; 113(2): 130-6.

Coffman, R.L., Seymour, B.W., Lebman, D.A., Hiraki, D.D., Christiansen, J.A., Shrader, B., Cherwinski, H.M., Savelkoul, H.F., Finkelman, F.D., Bond, M.W., et al (1988) The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 102: 5-28.

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*. Jun 11; 393(6685):537-44.

Content, J.; de la Cuvelierie, A.; De Wit, L.; Vincent-Levy-Frebault, V.; Ooms, J.; De Bruyn, J. (1991) The genes coding for the antigen 85 complexes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG are members of a gene family: cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for antigen 85-C of *M. tuberculosis*. *Infect Immun* 59: 3205-3212.

Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M. (2008) IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 180: 5771–5777.

Cooper, A.M. 2009; Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*;27:393–422.

Corbel, C., Melchers, F. (1984) The synergism of accessory cells and of soluble alpha-factors derived from them in the activation of B cells to proliferation. *Immunol Rev*. 78:51-74.

Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 2003;163:1009–21.

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.

Cranenburgh, R.M.; Hanak, J.A.; Williams, S.G.; Sherratt, D.J. (2001) *Escherichia coli* strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic Acids Res.* 29, E26.

Czerkinsky, C. & Holmgren, J. Enteric vaccines for the developing world: a challenge for mucosal immunology. *Mucosal Immunol.* 2, 284–287 (2009).

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

Darji, A., zur Lage, S., Garbe, A.I., Chakraborty, T., Weiss, S. (2000) Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27(4):341-9.

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

Davidson, J., Rosenkrands, I., Christensen, D. *et al.* (2005) Characterization of cationic liposomes based on dimethyldioctadecylammonium and synthetic cord factor from *M. tuberculosis* (trehalose 6,6'-dibehenate) – a novel adjuvant inducing both strong CMI and antibody responses. *Biochim Biophys Acta*; 1718: 22–31.

Davidson, A.H. *et al.* (2005). Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226: 240–245.

Davis, S.S., 2001 Nasal vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 51(1-3):21-42.

Denis, O.; Tanghe, A.; Palfliet, K.; Jurion, F.; van den Berg, T.P.; Vanonckelen, A.; Ooms, J.; Saman, E.; Ulmer, J.B.; Content, J.; Huygen K. (1998) Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial antigen 85A stimulates a CD41 and CD81 T-Cell epitopic repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Infection. *Infect Immun.* Apr 66(4): 1527-33

Delavallée, L.; Assier, E.; Denys, A.; Falgarone, G.; Zagury, J.F.; Muller, S.; Bessis, N.; Boissier, M.C. (2008) Vaccination with cytokines in autoimmune diseases. *Ann Med*; 40:343-51.

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

De Ruyter, P.G.; Kuipers, O.P.; De Vos, W.M. (1996) Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.*; 62: 3662-3667.

de Valliere, S., Abate, G., Blazevic, A., Heuertz, R.M., Hoft, D.F. (2005) Enhancement of cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect Immun*; 73:6711–20.

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

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.

Diehl, S., Anguita, J., Hoffmeyer, A., Zapton, T., Ihle, J. N., Fikrig, E., Rincon. M.(2000) Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* 13:805.

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

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.

Dixon, W.G., Hyrich, K.L., Watson, K.D., Lunt, M., Galloway, J., Ustianowski A. (2010) Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). *Ann Rheum*;69:522-8.

Dogi, C.A.,; de Moreno de LeBlanc, A.; Maldonado-Galdeano, C.; Perdigon, G.,. Bacterias comensales y probióticas: su influencia sobre el sistema inmune de mucosa intestinal. In: *Probioticos y salud*, Ed. Díaz-Santos, Madrid, España 2012.

Dorhoi, A., Kaufmann, S.H. (2009) Fine-tuning of T cell responses during infection. *Current Opinion in Immunology*; 367–77.

Dorhoi, A., Reece, S.T., Kaufmann, S.H.E. (2012) Immunity to intracellular bacteria. In:

Paul WE, editor. Fundamental immunology. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams, Wilkins; p. 973–1000

Dou, J., Chen, J.S., Wang, J., Chen, G.B., Zhao, F.S., Tang, Q., Fang, X.S., Chu, L.L., Pan, M. (2005). Novel Constructs of Tuberculosis Gene Vaccine and Its Immune Effect on Mice. *Cell Mol Immunol* 2(1):57-62

Dou, J., Tang, Q., Yu, F., Yang, H., Zhao, F., Xu, W., Wang, J., Hu, W., Hu, K., Liou, C., Feng He, X., Wang, Y. (2009) Investigation of immunogenic effect of the BCG priming and Ag85A- GM-CSF boosting in Balb/c mice model. *Immunobiology*. 215(2):133-42.

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. *Int J Immunogenet*; 39(2):183-90

D'Souza, S., Rosseels, V., Romano, M., Tanghe, A., Denis, O., Jurion, F., Castiglione, N., Vanonckelen, A., Palfliet, K., Huygen, K. (2003) Mapping of murine Th1 helper T-cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*; 71:483–93.

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.

Ehlers, M.R., Daffe, M. (1998) Interactions between Mycobacterium tuberculosis and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol* 6: 328-335.

Ehlers, S., Kutsch, S., Benini, J., Cooper, A., Hahn, C., Gerdes, J., Orme, I., Martin, C., Rietschel, E.T. (1999) NOS₂-derived nitric oxide regulates the size, quantity and quality of granuloma formation in *Mycobacterium avium-infected* mice without affecting bacterial loads. *Immunology* 98:313-323

El-Attar, L.M.; Scott, S.; Goh, S.; Good, L. (2011) A pestivirus DNA vaccine based on a non-antibiotic resistance Escherichia coli essential gene marker. *Vaccine* 30(9):1702-9.

Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med* 2001;344:1294–303.

Fan, X., Gao, Q., Fu, R. (2009) Differential immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines expressing proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model *Microbiol Res.*;164(4):374-82.

Faurez, F.; Dory, D.; Le Moigne, V.; Gravier, R.; Jestin A. (2010). Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine*. 21;28(23):3888-95

Feltquate, D.M. (1998) DNA vaccines: vector design, delivery, and antigen presentation. *J Cell Biochem*; S30–31:304–11.

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.

Fiorino, F.; Pettini, E.; Pozzi, G.; Medaglini, D.; Ciabattini, A. (2013) Prime-boost strategies in mucosal immunization affect local IgA production and the type of TH response. *Front Immunol*. 29: 4-128

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

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

Fujimura, Y. (2000) Evidence of M cells as portals of entry for antigens in the nasopharyngeal lymphoid tissue of humans. *Virchows Arch.*(6):560-6.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 90: 11478–11482.

Gabrysova, L., Nicolson, K.S., Streeter, H.B., Verhagen, J., Sabatos-Peyton, C.A., Morgan, D.J., Wraith, D.C. (2009) Negative feedback control of the autoimmune response through antigen-induced differentiation of IL-10-secreting Th1 cells. *J Exp Med* 206: 1755–1767.

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.

Galdeano, C.M.; de Moreno de LeBlanc, A.; Vinderola, G.; Bibas Bonet, M.; Perdigón, G. (2007) Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vaccine Immunol.*;14:485-92.

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.

Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, et al. 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* 2006; 368: 1575–1580.

Garmory, H.S.; Leckenby, M.W.; Griffin, K.F.; Elvin, S.J.; Taylor, R.R.; Hartley, M.G.; Hanak, J.A.; Williamson, E.D.; Cranenburgh, R.M. (2005) Antibiotic-free plasmid stabilization by operator-repressor titration for vaccine delivery by using live *Salmonella enterica* Serovar typhimurium. *Infect. Immun.* 4:2005-11

Garver, K.A.; LaPatra, S.E.; Kurath, G. (2005). Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon. *Dis. Aquat. Organ.* 64: 13–22.

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.

Geiger, T., Andus, T., Klapproth, J., Hirano, T., Kishimoto, T. Heinrich, P. C. (1988) Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur. J. Immunol.*18:717.

Giacomini, E., Iona E., Ferroni, L., Miettinen, M., Fattorini, L., Orefici, G. Julkunen, I., Coccia, E. M. (2001). Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J. Immunol.* 166:7033.

Gill, D.R.; Smyth, S.E.; Goddard, C.A.; Pringle, I.A.; Higgins, C.F.; Colledge ,W.H.; Hyde, S.C. (2001) Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1 α promoter. *Gene Ther.* 8, 1539–1546.

Giomarelli, B.; Provvedi, R.; Meacci, F.; Maggi, T.; Medaglini, D.; Pozzi, G.; Mori, T.; McMahon, J.B.; Gardella, R.; Boyd, M.R. (2002). The microbicide cyanovirin-N

expressed on the surface of commensal bacterium *Streptococcus gordonii* captures HIV-1. *AIDS*. 5;16(10):1351-6

Glenting, J. e Wessels S. (2005) Ensuring safety of DNA vaccines. *Microb Cell Fact* 4 26.

Glynn,A.; Roy,C.J.; Powell,B.S.; Adamovicz,J.J.; Freytag,L.C.; Clements,J.D. (2005) Protection against aerosolized *Yersinia pestis* challenge following homologous and heterologous prime-boost with recombinant plague antigens. *Infect.Immun*: 73, 5256–5261.

Goh, S. e Good, L. (2008) Plasmid selection in *Escherichia coli* using an endogenous essential gene marker. *BMC Biotechnol*. 11; 8-61.

Goonetilleke, N.P.; McShane, H.; Hannan, C.M.; Anderson, R.J.; Brookes, R.H.; Hill, A.V. (2003) Enhanced immunogenicity and protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* of bacille Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J Immunol* 171: 1602-1609.

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

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

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. (2000a) DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol*. 12(4):442-7

Gurunathan, S.; Klinman, D.M.; Seder, R.A. (2000b) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Ann Rev Immunol*;18:927–74.

Haddad, D.; Liljeqvist, S.; Ståhl, S.; Andersson, I.; Perlmann, P.; Berzins, K.; Ahlborg, N. (1997) Comparative study of DNA-based immunization vectors: effect of secretion signals on the antibody responses in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. Jul;18(3):193-202.

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., Quayle, A.J. (1991) Heat shock proteins: friend and foe? *Clin Exp Immunol*. 86(1):2-5.

Harth, G.; Horwitz, M.A.; Tabatadze, D.; Zamecnik, P.C. (2002) Targeting the Mycobacterium tuberculosis 30/32-KDa mycolyl transferase complex as a therapeutic strategy against tuberculosis: Proof of principle by using antisense technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15614-15619

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

Hill, A.V., Reyes-Sandoval, A., O'Hara, G., Ewer, K., Lawrie, A., Goodman, A., Nicosia, A., Folgari, A., Colloca, S., Cortese, R., Gilbert, S.C., Draper, S.J. (2010) Prime-boost vectored malária vaccines: progress and prospects. *Hum. Vaccin*. 6, 78–83.

Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K. H., and Kishimoto, T. (1985) Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5490.

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

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

Howard, M., Muchamuel, T., Andrade, S., Menon, S. (1993) Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 177: 1205–1208.

Hu, W.S.; 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.

Huibregtse, I.L.; Zaat, S.A.; Kapsenberg, M.L.; Sartori da Silva, M.A.; Peppelenbosch, M.P.; van Deventer, S.J.; Braat, H. (2011) Genetically Modified *Lactococcus lactis* for Delivery of Human Interleukin-10 to Dendritic Cells. *Gastroenterol Res Pract.* 2012:639291.

Hutchings, A.B., Helander, A., Silvey, K.J., Chandran, K., Lucas, W.T., Nibert, M.L., Neutra, M.R. (2004) Secretory immunoglobulin A antibodies against the sigma1 outer capsid protein of reovirus type 1 Lang prevent infection of mouse Peyer's patches. *J Virol.* (2):947-57.

Huygen, K.; D. Abramowicz, P.; Vandebussche, F; Jacobs, J.; De Bruyn, A.; Kentos, A.; Drowart, J. P.; Van Vooren; M. Goldman. (1992) Spleen cell cytokine secretion in *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect. Immun.* 60:2880–2886.

Huygen, K., Content, J., Denis, O., Montgomery, D. L., Yawman, A. M., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Orme, I. M., Baldwin, S., D'Souza, C., Drowart, A., Lozes, E., Vandebussche, P., Van Vooren, J.-P., Liu, M. A., and Ulmer, J. B. (1996) Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat. Med.* 2:893–898.

Huygen, K. (2003) On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of mycobacterial diseases. *Infect Immun*;71(4):1613-21.

Huygen K. (2005) Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect* 7:932-938

Indrigo, J., Hunter, Jr, R.L., Actor, J.K. (2002) Influence of trehalose 6,6_-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. *Microbiology* 148:1991.

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.

Igietseme, J.U., Eko, F.O., He, Q., Black, C.M. (2004) Antibody regulation of T-cell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev Vaccines* 3:23–34.

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

Ito Y. (1960) A tumor-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (Shope) of cottontail rabbits. *Virology*; 12:596-601.

Izadpanah, 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 Gastrointest Liver Physiol.* 280:710-9.

Iwaki, M.; Okahashi, N.; Takahashi, I.; Kanamoto, T.; Sugita-Konishi, Y; Aibara, K; et al. Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun.* 1990;58:2929-34.

Jabbal-Gill, I. (2010) Nasal vaccine innovation. *J. Drug Target.* 18, 771–786

Jacobs, M., Brown, N., Allie, N., Ryffel, B. (2000) Fatal *Mycobacterium bovis* BCG infection in TNF-LT- α -deficient mice. *Clin Immunol* 94:192-199

Joss, A., Akdis, M., Faith, A., Blaser, K., Akdis, C.A. (2000) IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol.* (6):1683-90.

Junior, J.M.R.; Lima, K.M.; Coelho-Castelo, A.A.M.; Martins, V.L.D.B.; Santos, S.A.; Faccioli, L.H.; Silva, C.L. (2004). Could a DNA vaccine be useful in the control of tuberculosis?. *J Bras Pneumol.* 30: 468-77.

Joosten SA, Ottenhoff TH. (2008) Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Human Immunology*;69 (11):760–70.

Johansen, F.E., Kaetzel, C.S. (2011) Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate plgR expression and its role in mucosal Mucosal Immunol. (6):598-602.

Kagnoff, M.F. and Eckmann, L. (1997) Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest.* 100:6-10.

Kamanaka, M., Kim, S.T., Wan, Y.Y., Sutterwala, F.S., Lara-Tejero, M., Galán, J.E., Harhaj, E., Flavell, R.A. (2006) Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* 25, 941–952

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.

Kaminski, R.W.; Turbyfill, K.R.; Chao, C.; Ching, W.M.; Oaks, E.V. (2009) Mucosal Adjuvanticity of *Shigella* Invaplex with DNA-based vaccines. *Clin Vaccine Immunol*. 16(4):574-586.

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.

Kanellos, T.; Sylvester, I.D.; Ambali, A.G.; Howard, C.R.; Russell, P.H. (1999) The safety and longevity of DNA vaccines for fish. *Immunology*; 96:307-13.

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. (2004) New issues in tuberculosis. *Ann Rheum Dis*. 63 Suppl 2:ii50-ii56.

Kaufmann S.H.E. (2010) Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response. *J Intern Med*. 267(4):337-53.

Kaufmann S.H.E. (2013) Tuberculosis vaccines: time to think about the next generation. *Semin Immunol*;25(2):172-81.

Kelsall, B. (2008) Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. *Mucosal Immunol*. 1, 460–469.

Keystone, E.C., Schiff, M.H., Kremer, J.M., Kafka, S., Lovy, M., DeVries, T., . Burge, J. (2004) Once-weekly administration of 50 mg etanercept in patients with active rheumatoid arthritis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*;50:353-63.

Khader, S.A., Bell, G.K., Pearl, J.E., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G.E., Shen, F., Eaton, S.M., Gaffen, S.L., Swain, S.L., Locksley, R.M., Haynes, L., Randall, T.D., Cooper, A.M. (2007) IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary

CD4(+) T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature Immunology*;8(4):369–77.

Kim, T.W.; Hung, C.F.; Juang, J.; He, L.; Hardwick, J.M.; Wu, T.C. (2004) Enhancement of suicidal DNA vaccine potency by delaying suicidal DNA-induced cell death. *Gene Ther*; 11:336-42.

Kitsis, R.N.; Buttrick, P.M.; McNally, E.M.; Kaplan, M.L.; Leinwand, L.A. (1991) Hormonal modulation of a gene injected into rat heart in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88:4138-42.

Kiyono, H., Bienenstock J., McGhee, J.R., Ernst, P.B. (1992) The mucosal immune system: features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Reg Immunol.* (2):54-62.

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.

Klinman, D.M.; Takeshita, F.; Kamstrup, S.; Takeshita, S.; Ishii, K.; Ichino, M.; Yamada, H. (2000) DNA vaccines: capacity to induce auto-immunity and tolerance. *Dev. Biol. (Basel)* 104, 45–51.

König, H.; Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Musts and in Wine.* (Eds.) H. König; G. Uden; J. Fröhlich, XVIII, 522 p.; pp. 3-29 Springer, Heidelberg.

Kopf, M., Herren, S., Wiles, M.V., Pepys, M. B., Kosco-Vilbois, M.H. (1998). Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J. Exp. Med.* 188:1895.

Kuipers, O.P.; De Ruyter, P.G.G.A.; Kleerebezem, M.; De Vos, W.M. (1998) Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnol.*; 64: 15-21.

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

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., Brookes, R., Wilkinson, R.J., Malin, A.S., Pathan, A.A., Andersen, P., Dockrell, H., Pasvol, G., and Hill, A.V. (1998) Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 270-275.

Lara A.R e Ramirez O.T. (2012) Plasmid DNA production for therapeutic applications Methods Mol Biol. 824:271-303.

Launois, P.; DeLeys R. ; N' Diaye Niang, M.; Drowart A.; Andrien M.; Dierckx P.; Cartel, J.L.; Sarthou, J.L. ; Van Vooren, J.P. and Huygen, K. (1994) T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. Infect. Immun. 62:3679–3687.

Lawn, S.D., Zumla, A.L. (2011). Tuberculosis. Lancet. 2011 Jul 2; 378 (9785):57-72

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.

Leal, I.S., Smedegard, B., Andersen, P., Appelberg, R. (1999) Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. Infect. Immun. 67:5747.

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.

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.

Lee S.F. (2003) Oral colonization and immune responses to *Streptococcus gordonii*: Potential use as a vector to induce antibodies against respiratory pathogens. *Curr Opin Infect Dis* 16 231-235.

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, C., Corraliza, I., Langhorne, J. (1999) A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infect Immun* 67: 4435–4442.

Lin, C.W.; Su, I.J.; Chang, J.R.; Chen, Y.Y.; Lu, J.J.; Dou, H.Y. (2012) Recombinant BCG co expressing Ag85B, CFP10, and interleukin-12 induces multifunctional Th1 and memory T cells in mice. *APMIS* 120(1):72-82.

Lin, H.; Parmacek, M.S.; Morle, G.; Bolling, S.; Leiden, J.M. (1990) Expression of recombinant genes in myocardium in vivo after direct injection of DNA. *Circulation*; 82:2217-21.

Lingnau K, Riedl K, von Gabain A. (2007) IC31 and IC30, novel types of vaccine adjuvant based on peptide delivery systems. *Expert Rev Vaccines*. 6: 741–6.

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.

Liu MA. (2011) DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev*. 239(1):62-84.

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

Loessner, H.; Endmann, A.; Leschner, S.; Bauer, H.; Zelmer, A.; zur Lage S.; Westphal, K.; Weiss, S. (2007) Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. *Int J Med Microbiol*. 298(1-2):21-6

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.

Lowrie, D.B., Tascon, R.E., Bonato, V.L., Lima, V.M., Faccioli, L.H., Stavropoulos, E., Colston, M.J., Hewinson, R.G., Moelling, K., Silva, C.L. (1999) Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 400 (6741):269–71.

Lu, S. (2009) Heterologous prime-boost vaccination. *Curr. Opin. Immunol.*; 21: 346–351.

Luckay, A.; Sidhu, M.K.; Kjekouk, R.; Megati, S.; Chong, S.Y.; Roopchand, V.; Garcia-Hand, D.; Abdullah, R.; Braun, R.; Montefiori, D.C.; Rosati, M.; Felber, B.K.; Pavlakis, G.N.; Mathiesen, I.; Israel, Z.R.; Eldridge, J.H.; Egan, M.A. (2007) Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J. Virol* 81(10): 5257–5269

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

Lugton, I. W. (1999) Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria," *Immunology and Cell Biology*, vol. 77, no. 4, pp. 364–372,

Lycke N. (2012) Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol.* (8):592-605.

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

McAleer, J. P. & Kolls, J. K. (2011) Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. *J. Leukoc. Biol.* 90, 263–270

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.; 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. *J. Infect. Dis.* 178 (1), 92–100.

MacGregor, R.R.; Boyer, J.D.; Ciccarelli, R.B.; Ginsberg, R.S.; Weiner, D.B. (2000) Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow up data. *J. Infect. Dis.* Jan; 181(1):406

McManus, D.P., Loukas, A.(2008) Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 21:225–42.

Macpherson, A.J.; Hunziker, L.; McCoy, K.; Lamarre, A. (2001) IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non pathogenic microorganisms. *Microbes Infect. Rev.*;3: 1021-1035.

Mapletoft, J.W., Latimer, L.; Babiuk, L.A., van Drunen Littel-vanden Hurk, S.(2010) Intranasal immunization of mice with a bovine respiratory syncytial virus vaccine induces superior immunity and protection compared to those by subcutaneous delivery or combinations of intranasal and subcutaneous prime-boost strategies. *Clin. Vaccine Immunol.* 17: 23–35.

Mattsson, J., Yrlid, U., Stensson, A., Schön, K., Karlsson, M.C., Ravetch, J.V., Lycke, N.Y. (2011) Complement activation and complement receptors on follicular dendritic cells are critical for the function of a targeted adjuvant. *J. Immunol.* 187, 3641–3652

Mairhofer, J.; Pfaffenzeller, I.; Merz, D.; Grabherr, R. (2007) A novel antibiotic free plasmid selection system: advances in safe and efficient DNA therapy. *Biotechnol. J.* 3, 83–89.

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

Martin, C. (2005) The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? *Eur Respir J.* 26:162-167.

Martinez, A.N., Mehra, S., Kaushal, D. (2013) Role of interleukin 6 in innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Infect Dis.*15;207(8):1253-61

Mayer, A. K. and Dalpke, A. H. (2007) Regulation of local immunity by airway epithelial cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 55, no. 6, pp. 353–362, 2007.

McAleer, J. P., Kolls, J. K.(2011) Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. *J. Leukoc. Biol.* 90, 263–270.

McCluskie, M.J.; Weeratna, R.D.; Payette, P.J.; Davis, H.L. (2002) Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*: 32, 179–185.

McKenzie, B. S., Brady, J. L., Lew, A. M (2004) Mucosal immunity: overcoming the barrier for induction of proximal responses. *Immunologic Research*, vol. 30, no. 1, pp. 35–71,

McShane, H.; Pathan, A.A.; Sander, C.R.; Goonetilleke, N.P.; Fletcher, H.A.; Hill A.V. (2005) Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 47–52.

McShane, H.; Pathan, A.A.; Sander, C.R.; Keating, S.M.; Gilbert, S.C; Huygen, K.; Fletcher, H. A.; Hill A.V. (2004) Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med.* 11, 1240-4.

Mendoza-Coronel E, Camacho-Sandoval R, Bonifaz LC, Lopez-Vidal Y (2011). PD-L2 induction on dendritic cells exposed to *Mycobacterium avium* downregulates BCG-specific T cell response. *Tuberculosis (Edinb)*,91(1):36-46.

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

Mestecky, J., Moldoveanu, Z., Russell, M.W. (2005) Immunologic uniqueness of the genital tract: challenge for vaccine development. *Am J Reprod Immunol.* (5):208-14.

Mestecky, J., Alexander, R. C., Wei, Q. & Moldoveanu, Z. (2011) Methods for evaluation of humoral immune responses in human genital tract secretions. *Am. J. Reprod. Immunol.* 65, 361–367

Mierau, I.; Kleerebezem, M. (2005) 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol.*;68(6):705-17.

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.

Minassian, A.M.; Rowland, R.; Beveridge, N.E.; Poulton, I.; Satti, I.; Harris, S.; Poyntz, H.; Hamill, M.; Griffiths, K.; Sander, C.R; Ambrozak, D.R.; Price, D.A.; Hill, B.J.; Casazza, J.P.; Douek, D.C.; Koup, R.A.; Roederer, M.; Winston, A.; Ross, J.; Sherrard, J.; Rooney, G.; Williams, N.; Lawrie, A.M.; Fletcher, H.A.; Pathan, A.A.; McShane, H.

(2011) A Phase I study evaluating the safety and immunogenicity of MVA85A, a candidate TB vaccine, in HIV-infected adults. *BMJ Open*. Nov 14;1(2): e 000223. Print 2011.

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.

Moldoveanu, Z., Clements, M.L., Prince, S.J., Murphy, B.R., Mestecky, J. (1995) Human immune responses to influenza virus vaccines administered by systemic or mucosal routes *Vaccine* (11):1006-12.

Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol*. 19, 683–765

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.

Mootoo, A., Stylianou, E., Arias, M.A., Reljic, R. (2009) TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 8(1):53-62.

Mosmann, T.R. e Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.

Munk, M. E.; De Bruyn, J.; Gras, H and Kaufmann, S. H. (1994) The *Mycobacterium bovis* BCG 32-kilodalton protein antigen induces humancytotoxic T-cell responses. *Infect. Immun*. 62:726–728

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.

Murtaugh, M. P and. Foss, D.L. (2002) Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet Immunol and Immunopathol* 87(3-4):109–121.

Nagabhushanam, V., Solache, A., Ting, L.M., Escaron, C.J., Zhang, J.Y., Ernst, J.D. (2003) Innate inhibition of adaptive immunity: Mycobacterium tuberculosis-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN-gamma. *J Immunol.* 171(9):4750-7.

Neutra, M.R. and Kozlowski, P.A. (2006) Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol.* 6:148-58.

Ni, J.; Nolte, B.; Arnold, A.; Fournier, P.; Schirmacher, V. (2009) Targeting anti-tumor DNA vaccines to dendritic cells via a short CD11c promoter sequence. *Vaccine,* 27:5480-5487.

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

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.

Ogasawara, N., Kojima, T., Go, M., Takano, K., Kamekura, R., Ohkuni, T., Koizumi, J., Masaki, T., Fuchimoto, J., Obata, K., Kurose, M., Shintani, T., Sawada, N., Himi, T. (2011) Epithelial barrier and antigen uptake in lymphoepithelium of human adenoids. *Acta Otolaryngol.* 2011 (2):116-23

O'Hara, G. A.; Duncan, C. J.; Ewer, K. J.; Collins, K. A.; Elias, S. C.; Halstead, F.D.; Goodman, A. L.; Edwards, N.J.; Reyes-Sandoval, A.; Bird, P.; Rowland, R.; Sheehy, S.H; Poulton, I.D.; Hutchings, C.; Todryk, S.; Andrews, L.; Folgari, A.; Berrie, E.; Moyle, S.; Nicosia, A.; Colloca, S.; Cortese, R.; Siani, L.; Lawrie, A.M.; Gilbert, S.C.; Hill, A.V. (2012) Clinical assessment of a recombinant simian adenovirus ChAd63: a potent new vaccine vector. *J. Infect. Dis.* 205, 772–781.

O'Leary, S., O'Sullivan, M.P., Keane, J. (2011) IL-10 blocks phagosome maturation in mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 45(1):172-80

Oliveira, S.C. (2004). Vacinas de DNA, cap. 24 (p. 495-511) In *Genômica*. São Paulo: Editora Atheneu (1114 p.).

Olsen, A.W., Brandt, L., Agger, E.M., van Pinxteren, L.A., Andersen, P. (2004) The

influence of remaining live BCG organisms in vaccinated mice on the maintenance of immunity to tuberculosis Scand J Immunol 60(3):273-7.

Oosterhuis, K.; van den Berg, J.H.; Schumacher, T.N.; Haanen, J.B.(2012) DNA vaccines and intradermal vaccination by DNA tattooing.Curr Top Microbiol Immunol 351:221-50.

Ogra, P.L., Faden, H., Welliver, R.C. (2001) Vaccination strategies for mucosal immune responses. Clin Microbiol Rev. (2):430-45.

Orme, I.M. (2006) Preclinical testing of new vaccines for tuberculosis: a comprehensive review. Vaccine; 24: 2–19.

Osorio, M.; Wu, Y.; Singh, S.; Merkel, T.J. Bhattacharyya S, Blake MS, Kopecko DJ. (2009) Anthrax protective antigen delivered by *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a protects mice from a lethal anthrax spore challenge. Infect Immun. 77(4):1475-82.

Ottenhoff, T.H., Lewinsohn, D.A.L.D.M. (2008) Human CD4 and CD8 T cell responses to Mycobacterium tuberculosis: antigen specificity, function, implications and applications. In: Kaufmann SHE, Britton WJ, editors. Handbook of tuberculosis: immunology and cell biology. Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany; p. 119–56.

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., Hymowitz, S.G. (2011) Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. Annu Rev Immunol 29: 71–109.

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

Paris, R.M., Kim, J. H., Robb, M. L., Michael, N. L. (2010) Prime-Boost immunization with poxvirus or adenovirus vectors as a strategy to develop a protective vaccine for HIV-1. *Expert Rev Vaccines* 9, 1055–1069

Parker, S.E.; Borellini, F.; Wenk, M.L.; Hobart, P.; Hoffman, S.L.; Hedstrom, R.; Le, T.; Norman, J.A. (1999) Plasmid DNA malaria vaccine: Tissue distribution and safety studies in mice and rabbits. Hum Gene Ther; 10:741-58.

Pattani, A., McKay, P. F., Garland, M. J., Curran, R. M., Migalska, K., Cassidy, C. M., et al. (2012). Microneedle mediated intradermal delivery of adjuvanted recombinant HIV-1 CN54gp140 effectively primes mucosal boost inoculations.

Peek, L.J.; Middaugh, C.R.; Berkland, C. (2008) Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*; 60:915-28.

Pethe, K., Alonso, S., Biet, F., Delogu, G., Brennan, M.J., Locht, C., Menozzi, F.D.(2001) The heparin-binding hemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature* 412:190–4.

Perdigón, G.; Fuller, R.; Raya, R. (2001) Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr Issues Intest Microbiol.*;2:27-42.

Perdigón, G.; Maldonado Galdeano, C.; Valdez, J.C.; Medici, M. (2002) Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr.*;56:21-6.

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

Perry, M., Whyte, A. (1998) Immunology of the tonsils, *Immunol Today* 414–421.

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

Pilgrim, S.; Stritzker, J.; Schoen, C; Kolb-Mäurer, A.; Geginat, G.; Loessner, M.J.; Gentschev, I. Goebel, W. (2003) Bactofection of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: improvement and mechanism of DNA delivery. *Gene Ther.* 10(24):2036-45

Pisetsky, D.S. (1996) Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. *Immunity.*5 (4):303-10.

Plotkin, S. A. (2010) Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 1055–1065

Pokorna, D.; Rubio, I.; Muller, M. (2008) DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. *Genetic Vaccines and Therapy*; 6(4)1-8.

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) e 44892.

Prausnitz, M.R. and Langer, R. (2008) Transdermal drug delivery. Nat Biotechnol; 26:1261-8.

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.

Quiding, M., Nordström, I., Kilander, A., Andersson, G., Hanson, L.A., Holmgren, J., Czerkinsky, C. Intestinal immune responses in humans. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses and interferon- γ production and evokes local immunological memory. J. Clin. Invest. 88, 143–148 (1991).

Rahman M. (2006). Introduction to Flow Cytometry. Oxford, UK: Serotec Ltd;16-23. Disponível em <<http://www.abdserotec.com/uploads/flow-cytometry.pdf>> Acesso em set/2011.

Radosevic, K., Rodriguez, A., Lemckert, A., and Goudsmit, J. (2009) Heterologous prime-boost vaccinations for poverty-related diseases: Advantages and future prospects. *Expert Rev. Vaccines* 8, 577–592.

Redford, P.S., Boonstra, A., Read, S., Pitt, J., Graham, C., Stavropoulos, E., Bancroft, G.J., O'Garra, A. (2010) Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. Eur. J. Immunol. 40: 2200–2210.

Reece, S.T., Kaufmann, S.H. (2012) Floating between the poles of pathology and protection: can we pin down the granuloma in tuberculosis? Current Opinion in Microbiology (1):63–70.

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

Reljic, R., Ivanyi, J. (2006) A case for passive immunoprophylaxis against tuberculosis. Lancet Infect Dis 6:813–18.

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

Rodrigues, J.R.; J.M.; Lima K.M.; Coelho-Castelo, A.A.M; Martins, V.L.D. B; dos Santos S.A. Faccioli, L.H.;Silva C.L. (2004). É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? J Bras Pneumol 2004; 30 (4) 468-77.

Romano, M.; D'Souza,S.; Adnet, P.Y.; Laali, R.; Jurion, F.; Palfliet, K.; Huygen, K. (2006) Priming but not boosting with plasmid DNA encoding mycolyl-transferase Ag85A from *Mycobacterium tuberculosis* increases the survival time of *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated mice against low dose intravenous challenge with *M. tuberculosis* H37Rv. Vaccine 24 (16): 3353-64.

Romagnani S. (2005) Cytokines. In: Kaufmann SHE, Steward MW, editors. Immunology. 10th ed. London/Washington, D.C.: Hodder Arnold/ASM Press; 2005. p. 273–99.

Rowland, R., Mc Shane, H. (2011) Tuberculosis vaccines in clinical trials. Expert Rev. Vaccines 10, 645–658.

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.

Sato, Y., Roman, M., Tighe, J., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M. D., Silverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A., Raz, E. (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. Science 273:352–354.

Saunders, B.M., Frank, A.A., Orme, I.M., Cooper, A.M. (2000) Interleukin-6 induces early interferon- γ production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Infect. Immun. 68:3322.

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

Schaible, U.E., Winau, F., Sieling, P.A., Fischer, K., Collins, H.L., Hagens, K., Modlin, R.L., Brinkmann, V., Kaufmann, S.H. (2003). Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. Nature Medicine ;9(8):1039–46.

Schalk, J.A.; Mooi, F.R.; Berbers, G.A.; van Aerts, L.A.; Overlgonne, H.; Kimman, T.G.(2006) Preclinical; and clinical safety studies on DNA vaccines.Hum Vaccin. 2:45-53.

Schandené, L., Alonso-Vega, C., Willems, F., Gérard, C., Delvaux, A., Velu, T., Devos, R., de Boer, M., Goldman, M. (1994) B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. J Immunol.152(9):4368-74.

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.

Schoen, C.; Loeffler, D.I.; Frentzen, A.; Pilgrim, S.; Goebel, W.; Stritzker, J. (2008) *Listeria monocytogenes* as novel carrier system for the development of live vaccines. *Int J Med Microbiol* 2008; 298:45-58.

Schou, C.; Yuan, Z.L.; Andersen, A.B.; Bennedsen, J. (1985) Production and partial characterization of monoclonal hybridoma antibodies to Mycobacterium tuberculosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]* 93: 265-272.

Scriba, T.J.; Tameris, M.; Smit, E.; van der Merwe, L.; Hughes, E.J.; Kadira, B.; Mauff, K.; Moyo, S.; Brittain, N.; Lawrie, A.; Mulenga, H; de Kock, M.; Makhethhe, L.; van Rensburg, E.J.; Gelderbloem ,S.; Veldsman, A.; Hatherill, M.; Geldenhuys, H.; Hill, A.V; Hawkrige, A.; Hussey, G.D.; Hanekom, W.A.; McShane, H.; Mahomed, H. (2012) A phase IIa Trial of the new TB Vaccine, MVA85A, in HIV and/or M. Tuberculosis Infected Adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 7:769-78.

Shahabi, V.; Maciag, P.C.; Rivera, S.; Wallecha, A. 2010 Live, attenuated strains of *Listeria* and *Salmonella* as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioeng Bugs.*1(4): 235–239.

Shedlock, D.J. and Weiner, D.B. 2000 DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J.Leukoc Biol* 68(6):793-806.

Sheehy, S.H.; Duncan, C.J.; Elias, S.C.; Biswas, S.; Collins, K.A.; O'Hara, G.A.; Halstead, F.D.; Ewer, K.J.; Mahungu, T.; Spencer, A.J.; Miura, K.; Poulton, I.D.; Dicks, M.D.; Edwards, N.J.; Berrie, E.; Moyle, S.; Colloca, S.; Cortese, R.; Gantlett, K.; Long, C.A.; Lawrie, A.M.; Gilbert, S.C.; Doherty, T.; Nicosia, A.; Hill, A.; Hill, A.V.; Draper, S.J. (2012) Phase Ia clinical evaluation of the safety and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* blood-stage antigen AMA1 in ChAd63 and MVA vaccine vectors. *PLoS ONE* 7: e31208.

Shepherd, C.T. and Scott, M.P. (2008) Construction and evaluation of a maize chimeric promoter with activity in kernel endosperm and embryo. *Biotechnol Appl Biochem* 52:233-43.

Silver, R.F., Wallis, R.S.; Ellner, J. J. (1995) Mapping of T cell epitopes of the 30-kDa antigen of *Mycobacterium bovis* strain bacillus Calmette-Guerin in purified protein derivative (PPD)-positive individuals. *J. Immunol.* 154:4665–4674.

Silva, C.L. *et al.* (2004). *Vacinas Gênicas*, cap. 23 (p. 463-494) In *Genômica*. São Paulo: Editora Atheneu (1114 p.).

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

Simon, J. K., Maciel, M. Jr, Weld, E.D., Wahid, R., Pasetti, M.F., Picking W.L., Kotloff, K.L., Levine, M.M. (2011) Antigen-specific IgA B memory cell responses to *Shigella* antigens elicited in volunteers immunized with live attenuated *Shigella flexneri* 2a oral vaccine candidates. *Clin. Immunol.* 139, 185–192

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.

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.

Sleator, R.D.; Gahan, C.G.M.; O'Driscoll, B.; Hill, C. (2000) Analysis of the role of betL in contributing to the growth and survival of *Listeria monocytogenes* LO28. *Int J Food Microbiol.* 25;60(2-3):261-8

Sodenkamp, J., Waetzig, G.H., Scheller, J., Seegert, D., Grötzinger, J., Rose-John, S.,

Ehlers, S., Hölscher, C. Therapeutic targeting of interleukin-6 trans-signaling does not affect the outcome of experimental tuberculosis. (2012) *Immunobiology*. 217(10):996-1004

Stahl, S.; Samuelson, P., Hansson., M., Andréoni, C., Goetsch, L., Libon, C., Liljeqvist, S., Gunneriusson., E., Binz, H., Nguyen, T.N. and Uhlén, M. , Development of non-pathogenic staphylococci as vaccine delivery vehicles. In *Recombinant Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal* in: J.M.a.P. Wells, G. (Ed.) *Development of non-pathogenic staphylococci as vaccine delivery vehicles*. In *Recombinant Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal* R. G. Landes Biomedical Publishers, New York, 1997, pp. 61-81.

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.

Sterne, J.A.; Rodrigues, L.C.; Guedes, I.N. (1998) Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *Int J Tuberc Lung Dis*; 2 (March (3)):200–7.

Stewart, A.J. and Devlin, P.M. (2006) The history of the smallpox vaccine. *J Infect*; 52:329-34.

Tamura e Kurata, Tamura, S. I., Kurata, T. (2004) Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, vol. 57, no. 6, pp. 236–247.

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

Tanghe, A., Lefèvre, P., Denis, O. ,D’Souza, S. , Braibant, M. , Lozes, E, Singh M, Montgomery, D., Content, J., Huygen, K. Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors. *JImmunol*1999;162:1113–9.

Tao, L., Pavlova, S.I., Ji, X., Jin, L., Spear, G. (2011). A novel plasmid for delivering genes into mammalian cells with noninvasive food and commensal lactic acid bacteria. *Plasmid*. 65(1):8-14

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.

Teitelbaum, R., Glatman-Freedman, A., Chen, B., Robbins, J.B., Unanue, E., Casadevall, A., Bloom, B.R. (1998) A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. Proc Natl Acad Sci USA 95:15688–93.

Tengvall, S., Lundgren, A., Quiding-Jarbrink, M. & Svennerholm, A. M. BAFF, stimulatory DNA and IL-15 stimulates IgA+ memory B cells and provides a novel approach for analysis of memory responses to mucosal vaccines. Vaccine 28, 5445–5450 (2010).

Thacker, E.L. *et al.* (2006). Plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone efficacy in reducing disease associated with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Anim. Sci.* 84: 733–742.

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.

Tubach, F., Salmon, D., Ravaud, P., Allanore, Y., Goupille, P., Bréban, M., Pallot-Prades, B., Pouplin, S., Sacchi, A., Chichemanian, R. M., Bretagne, S., Emilie, D., Lemann, M., Lortholary, O., Mariette, X. (2009) Risk of tuberculosis is higher with anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy than with soluble tumor necrosis factor receptor therapy: The three-year prospective French Research Axed on Tolerance of Biotherapies registry. *Arthritis Rheum*;60:1884-94.

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.

Twigg, H.L. 3rd. (2005) Humoral immune defense (antibodies): recent advances. *Proc Am Thorac Soc.* (5):417-21.

Ulrichs, T.; Kaufmann, S.H.E. (2006) New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol*; 208: 261–9.

Urdahl, K.B., Shafiani, S., Ernst, J.D. (2011). Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal Immunol.* 4(3):288-93 LER

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 de Guchte, M.; Penaud, S.; Grimaldi, C.; Barbe, V.; Bryson, K.; Nicolas, P.; Robert, C.; Oztas, S.; Mangenot, S.; Couloux, A.; Loux, V.; Dervyn, R.; Bossy, R.; Bolotin, A.; Batto, J.M.; Walunas, T.; Gibrat, J.F.; Bessières, P.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S.D.; Maguin, E. (2006). The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 13;103(24):9274-9.

van de Putte, L.B., Atkins, C., Malaise, M., Sany, J., Russell, A.S., van Riel, P.L., Settas, L., Bijlsma, J.W., Todesco, S., Dougados, M., Nash, P., Emery, P., Walter, N., Kaul, M., Fischkoff, S., Kupper, H. (2004) Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed. *Ann Rheum Dis*;63:508-16.

van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zom, M., Pierson, J., Pierson, J., Brenner, M., Peters, P.J. (2007) *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*;129(June (7)):1287–98.

van Egmond, M., Damen, C.A., van Spriel, A.B., Vidarsson, G., van Garderen, E., van de Winkel, J.G. (2001). IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol.* (4):205-11.

Vanniasinkam, T.; Reddy, S.T.; Ertl, H.C. (2006) DNA immunization using a non-viral promoter. *Virology*; 344:412-20.

Van Snick, J., Vink, A., Cayphas, S., Uyttenhove, C. (1987) Interleukin-HP1, a T cell-derived hybridoma growth factor that supports the in vitro growth of murine plasmacytomas. *J. Exp. Med.* 165:641.

Vassaux G, Nitcheu J, Jezzard S, Lemoine NR. (2006). Bacterial gene therapy strategies. *J Pathol.* 208(2):290-8

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

Vintiñi, E.; Alvarez, S.; Medina, M.; Medici, M.; De Budeguer, M.V.; Perdigón, G. (2000) Gut mucosal immunoestimulation by lactic acid bacteria. *Biocell.*24:223-32.

Waine, G.J.; McManus, D.P. Nucleic Acids: Vaccines of the future. *Parasitology Today*, California, v.11, n.3,p.113-116, 1995.

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.

Weissenbach, J., Chernajovsky, Y., Zeevi, M., Shulman, L., Soreq, H., Nir, U., Wallach, D., Perricaudet, M., Tiollais, P., Revel, M. (1980) Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and *Escherichia coli* cloning studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7152.

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.* 2:423-445.

Whaley, K.J., Zeitlin, L. (2005) Preventing transmission: plant-derived microbicides and mucosal vaccines for reproductive health. *Vaccine.* (15):1819-22.

WHO: BCG Vaccine. *Weekly Epidemiological Record* 2004, 4.

WHO (World Health Organization). (2005) Global tuberculosis control. Surveillance, planning, financing. WHO, Geneva, Switzerland.

WHO 2004 (World Health Organization). The Global Burden of Disease WHO, Geneva, Switzerland

WHO (World Health Organization). (2011) WHO REPORT 2011: Global Tuberculosis Control. Surveillance, planning, financing. WHO, Geneva, Switzerland.

Wiker, H.G.; Harboe, M.; Nagai, S. (1991) A localization index for distinction between extracellular and intracellular antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol.* 137(4):875-84.

Wiker, H.G.; Nagai, S.; Harboe, M.; Ljungqvist, L. (1992) A family of cross-reacting proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 36: 307-319.

Wiker, H.G.; Sletten, K.; Nagai, S.; Harboe, M. (1990). Evidence for Three Separate Genes Encoding the Proteins of the Mycobacterial Antigen 85 Complex. *Infection and Immunity* 272-274.

Williams, J.A.; Carnes, A.E.; Hodgson, C.P. (2009) Plasmid DNA Vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv.*; 4: 353–370.

Williams, A., Reljic, R., Naylor, I., Clark, S.O., Falero-Diaz, G., Singh, M., Challacombe, S., Marsh, P.D., Ivanyi, J. (2004) Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculosis early infection of the lungs. *Immunology* 111:328–33.

Winau, F., Weber, S., Sad, S., de Diego, J., Hoops, S.L., Breiden, B., Sandhoff, K., Brinkmann, V., Kaufmann, S.H., Schaible, U.E. (2006) Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*;24:105–17.

Wolff, J.A.; Malone, R.W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P.L. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247, 1465–1468.

Li, W., Deng, G., Li, M., Liu, X., Wang, Y. (1997) Roles of Mucosal Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* Infection

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.

Xiao, S.; Chen, H.; Fang, L.; Liu, C.; Zhang, H.; Jiang, Y.; Hong, W. (2004) Comparison of immune responses and protective efficacy of suicidal DNA vaccine and conventional DNA vaccine encoding glycoprotein C of pseudorabies virus in mice. *Vaccine*; 22:345-51.

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.

Yoshida, T.; Sakamoto, A.; Iwamoto, Y. (2009) Vascularized iliac bone graft in cases of ankle tuberculosis. *J Reconstr Microsurg*. 25(2):125-31

Zaman, M., Chandrudu, S., Toth, I. (2013) Strategies for intranasal delivery of vaccines. *Drug Deliv Transl Res*. 3(1):100-109.

Zao, K.N.;Chen, J (2011) Codon usage roles in human papilloma virus. *Rev Med Virol*.6: 397-411.

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

ANEXOS

Anexos I

Meios e Soluções:

Acetato de Sódio (3 M): 12,3 g de acetato de sódio; água destilada q.s.p 50 mL.

Acetato de Amônio (7,5 M): 128,1 g de acetato de amônio; água destilada q.s.p 1000 mL.

Ampicilina (100 mg/mL): 1000 mg de Ampicilina foram dissolvidos em 10 mL de água MiliQ (Merck) e a solução foi esterelizada, com auxílio de um filtro 0,22 µm (Corning), em capela de fluxo laminar.

Brain Heart Infusion (BHI): 37 g do meio BHI (Himedia[®]) foram pesados na balança analítica e em seguida foi acrescentada água destilada, completando-se o volume pra 1 L. Para o preparo de meio sólido, 1 L do meio BHI líquido foi acrescido de 15 g de ágar bacteriológico (Difco). Posteriormente, o meio foi esterelizado durante 15 minutos a 121°C e distribuído em placas de petri. Composição do meio: infusão de cérebro de bezerro 200 g/L; infusão de coração 250 g/L; peptona 10 g/L; dextrose 2 g/L; cloreto de sódio 5 g/L; fosfato dissódico 2,5 g/L; pH 7,4 ± 2, a 25°C (Himedia[®]).

Brometo de etídio: Solução estoque a 5mg/mL; Utilizou-se a 0,5 µg/mL.

Canamicina (100 mg/mL): 1000 mg de Cloranfenicol (Sigma) foram dissolvidos em 10 mL de álcool etílico PA (Merck) e a solução foi filtrada em um filtro 0,22 µm (Corning) em capela de fluxo laminar.

Carbonato Monoácido de Sódio (NaHCO₃ 0,025M): 2,2 g de NaHCO₃ foram dissolvidos em 1 L de meio

Cloranfenicol (10 mg/mL): 100 mg de cloranfenicol foram dissolvidos em 10 mL de etanol absoluto PA e a solução foi esterilizada, com o auxílio de um filtro de 0,22 µm, em capela de fluxo laminar.

DMSO 5%(v/v)(Sigma): 5 mL de DMSO; 95 mL de água destilada.

Etanol 70%: 70 mL de etanol absoluto; 30 mL de água destilada.

Etanol 96%: 96 mL de etanol absoluto; 4 mL de água destilada.

Eritromicina (50mg/mL): 500 mg de Eritromicinal (Sigma) foram dissolvidos em 10 mL de álcool etílico PA (Merck) e a solução foi filtrada em um filtro 0,22 µm (Corning) em capela de fluxo laminar (Pachane).

Glicerol (10%): 100 mL de glicerina foram diluídos em 900 mL de água destilada e em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação à 121°C durante 15 minutos.

Glicerol (80%): 80 mL de glicerina foram diluídos em 20 mL de água ultrapura e em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação à 121°C durante 15 minutos.

Glicerina Tamponada pH 9.0: 9 mL de glicerina e 1 mL de Tampão Bicarbonato, ajustar o pH para 9.0. Estocar a 4°C.

Glicogênio (20 mg/mL): 100 mg de glicogênio dissolvidos em 5 mL de água destilada.

HEPES (Sigma) 1 M: 23,9 g de HEPES foram dissolvidos em 80 mL de água ultrapura, o pH foi ajustado em 7,2 e completou-se o volume para 100 mL. A solução foi esterilizada utilizando-se filtro de 0,22 µm.

Hidróxido de Sódio (NaOH 5M): 10g de NaOH, completar o volume para 50mL com água destilada.

L-glutamina (Sigma): 14,6 g de L-glutamina foram dissolvidos em água ultrapura q.s.p. 500 mL. A solução foi esterilizada utilizando-se filtro de 0,22 µm.

Luria-Bertani (LB): 25 g de meio LB (Accumedia[®]) completando-se o volume para 1 L água destilada. Para preparo de meio sólido, 1 L de meio LB líquido foi acrescido de 15 g de ágar bacteriológico (Himedia[®]). Os meios foram esterilizados por autoclavação à 121°C, durante 20 minutos. Composição: digestão enzimática de caseína 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; cloreto de sódio 10 g/L; pH 7,3 ± 0,2 à 25°C.

Meio F12 Ham (Sigma): o meio F12 foi preparado conforme recomendações do fabricante, esterilizado a vácuo utilizando-se filtro de 0,22 µm, sendo o pH ajustado para 7,0 e o meio armazenado à 4°C. O meio completo, por sua vez, foi preparado adicionando-se ao F12, 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de L-glutamina (Sigma), 100 ng/mL de zeocina e 2,5% de HEPES (Sigma), todos filtrados anteriormente ou estéreis. Após preparo, o meio F12 completo passou por um teste de esterilidade, onde 200 µL do meio foram colocados em meios de cultura para bactérias (BHI e TSB), fungos e leveduras (Sabouraud) e mantidos à 37°C ou temperatura ambiente, respectivamente. Além disto, 3 mL do meio completo também foram colocados em vidro estéril em estufa à 37°C. Durante 14 dias, o crescimento de bactérias e fungos foi acompanhado, sendo que com 5 dias sem contaminação, o meio pôde ser utilizado.

Miniprep (Soluções)

Solução I (Ressuspensão): 0,45 g de glicose anidra; 2,5 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 8.0; 1 mL de EDTA 0,5 M pH 8.0; água destilada q.s.p. 50 mL.

Solução II (Lise): 200 µL de NaOH 5 M; 250 µL de SDS 20%; água destilada q.s.p. 5 mL. Esta solução deve ser preparada no momento de sua utilização.

Solução III (Neutralização): 30 mL de acetato de potássio 5 M; 5,75 mL de ácido acético glacial; água destilada q.s.p. 50 mL.

M17 Sacarose Glicose (M17-Sac-Gli): 21 g de meio de cultivo M17 (Fluka Analytical® Sigma) e dissolvidos em 250mL de água destilada, assim o meio fica concentrado 2X. A solução de sacarose foi preparada dissolvendo-se 85,5 g em 250 mL de água destilada, resultando em uma solução 1 M. O meio M17 e a solução de sacarose foram esterilizados, separadamente, por autoclavação à 121°C durante 15 minutos; a glicose 50%, por sua vez, foi preparada dissolvendo-se 50 g de glicose anidra em água destilada q.s.p 100 mL, sendo esterilizada utilizando-se um filtro de 0,22 µm. O meio M17, a solução de sacarose e 5 mL de glicose 50% foram misturados, sob condições de esterilidade, resultando em M17 1X, Sacarose 0,5 M e Glicose 0,5% (M17-Sac-Gli). Composição: triptona 2,5g/L; peptona de carne 2,5g/L; peptona de soja 5 g/L; extrato de levedura 2,5g/L; extrato de carne 5 g/L; glicerofosfato de sódio 19 g/L; sulfato de magnésio 0,25g/L; ácido ascórbico 0,5g/L; lactose 5 g/L; pH 7,0 ± 0,2 à 25°C.

Paraformaldeído 3%: 10 mL de PBS 1 X, 0,3g de paraformaldeído e 25µL de NaOH 5 M. Aquecer a 60°C a mistura para dissolver. Preparar em capela de exaustão no dia de uso.

Paraformaldeído 4%: 10mL de PBS 1X, 0,4g de paraformaldeído e 25µL de NaOH 5 M. Aquecer a 60°C a mistura para dissolver. Preparar em capela de exaustão no dia de uso.

PBS/BSA 1%: 1g de BSA (USBiological) em 100mL de PBS 0,15M. Estocar a -20°C.

PBS-caseína (Solução de Bloqueio): 1000mL de PBS 1x pH 7,2 e 2,5g de caseína. Acrescentar a caseína ao PBS aquecido e filtrar em gaze caso necessário. Estocar a -20°C.

PBS + 0,1% Triton X-100: 100µL de Triton X-100 (Sigma) e completar para 100 mL de PBS 0,15M. Estocar temperatura ambiente.

PBS 0,15M (1X): 80,03g de NaCl (sigma), 2,0121g de KH₂PO₄ (Sigma), 2,0165g de KCl (Merck), 9,1163g de Na₂HPO₄ (Crq) e completar o volume para 10 litros. Autoclavar 121°C 15 minutos.

PEG3000 30% e glicerol 10%: 3 g de PEG3000, 1 mL de glicerol e água destilada q.s.p. 10 mL.

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 50mg/mL) e 0,9 mL de Estreptomicina (estoque a 25 mg/mL).

Sacarose 0.5 M e glicerol 10%: 171,1g de sacarose, 100mL de glicerina e água destilada q.s.p 1L, sendo a solução esterilizada por autoclavação à 121°C durante 15 minutos.

Salina-Tween (10X): 85g de NaCl, 5mL de Tween 20 e completar para 1000mL com água bidestilada (concentração de uso 1x)

Solução de Ácido sulfúrico: 53,24mL de H₂SO₄ em 1000mL de água bidestilada.

Solução de Revelação: 4mg de OPD, 10mL de tampão citrato e 2µL de H₂O₂. Preparar no momento do uso e proteger da luz.

Tampão Carbonato (Coating buffer): 1,86g de Na₂CO₃ e 2,93g de NaHCO₃, completar o volume com água bidestilada para 1000mL ajustando-se o pH para 9,6. Estocar a 4°C.

Tampão de amostra (Gel agarose): Glicerol 50%; Azul de bromofenol 0,20%; TBE 2,5X.

TE-LYS: 500 μ L de TE 10X, 100mg de lisozima e água destilada q.s.p 10 mL.

TBE (0,5X): 100 mL de TBE 5X (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 1 L) em água destilada q.s.p 1 L.

Zeocina (*invitorgen*): Concentração estoque 100 mg/mL