



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GUILHERME PAIER MILANEZ

**Construção de linhagens atenuadas de *S. enterica* Typhimurium
produtoras de antígeno de *Plasmodium***

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Guilherme Paier Milanez</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M589c Milanez, Guilherme Paier, 1986-
Construção de linhagens atenuadas de *S. enterica*
Typhimurium produtoras de antígeno de *Plasmodium* /
Guilherme Paier Milanez. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marcelo Brocchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Salmonella. 2. Expressão heteróloga. 3.
Malária. 4. Vacinas atenuadas. I. Brocchi, Marcelo,
1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Construction of attenuated strains of *S. enterica Typhimurium*
producing antigen of *Plasmodium*

Palavras-chave em Inglês:

Salmonella

Attenuated vaccines

Heterologous expression

Malaria

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Brocchi [Orientador]

Alessandro dos Santos Farias

Gustavo Costa Bressan

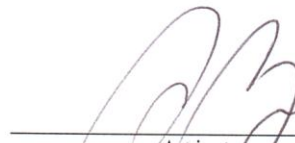
Data da defesa: 27-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

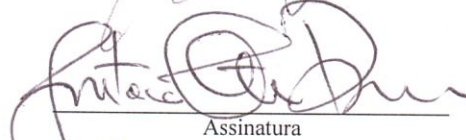
Campinas, 27 de Fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Brocchi (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Gustavo Costa Bressan


Assinatura

Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili

Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Este trabalho foi realizado no
Laboratório de Genômica e
Biologia Molecular Bacteriana,
Instituto de Biologia - Unicamp
e contou com o apoio financeiro
das agências de fomento FAPESP,
CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir acertar, errar e concertar.

Aos meus pais, por serem meus mentores e conselheiros, e por se fazerem próximos, mesmo estando tão longe.

Ao meu irmão Henrique, e ao meu primo/irmão Carlos, por tornarem a minha vinda para Campinas muito mais fácil e agradável.

A minha amada namorada Rhayany, pelo amor e carinho, e por aguentar bravamente a distância.

Ao meu orientador, Prof. Marcelo Brocchi, por ter sido muito mais que um excelente mentor acadêmico, mas um grande amigo.

Aos grandes amigos que fiz, Igor e Marcos, e aos outros amigos do laboratório, Bruna, Gustavo, Marcela, Jéssica, Meire e Adriane, pela ajuda nos experimentos e pelo dia-a-dia sempre agradável.

Ao apoio técnico do Evandro e da Isildinha.

Aos laboratórios e professores do IB que se dispuseram a me ajudar sempre que necessário.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

À Unicamp e ao programa de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular por me permitirem ser treinado como futuro pesquisador.

***“O dia em que quiserdes ter sabedoria
com a mesma vontade com que quisestes
respirar, então sereis um grande sábio”***

*Arquimedes, Cientista grego
(287 a.C. – 212 a.C.).*

RESUMO

A Salmonelose e a malária são duas doenças infecciosas negligenciadas de grande prevalência no mundo, mas acometendo particularmente populações humanas que vivem em regiões e países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Apesar dos esforços ainda não existem formulações vacinais totalmente efetivas no controle destas enfermidades. Desta forma, nosso grupo tem buscado aprimorar a expressão do Domínio M2 do antígeno MAEBL de *Plasmodium yoelii*, que apresenta similaridade com a proteína de *Plasmodium falciparum*, em linhagens de *Salmonella enterica* Typhimurium, atenuadas para virulência. Em estudos prévios constatou-se que a expressão em níveis baixos não seria suficiente para a indução de uma resposta imune protetora. Com isso, ficou clara a necessidade de se aprimorar os níveis de expressão deste antígeno nas linhagens a serem testadas. Para tanto, o vetor de expressão anteriormente utilizado foi modificado, os codons da sequência a ser expressa foram otimizados para expressão em salmonela e um sinal de secreção periplasmática foi adicionado no início da sequência a ser expressa. Adicionalmente, modificamos novas linhagens atenuadas de *S. enterica* desenvolvidas por nosso grupo de tal forma a utiliza-las na expressão de antígenos heterólogos, empregando um sistema letal balanceado (Asd) de estabilização da expressão gênica. Apesar do sucesso na construção dos novos vetores, e da otimização de *codons* para a expressão, constatamos um possível efeito deletério do domínio M2 quando expresso em grande quantidade, o que impossibilitou a obtenção de algumas construções planejadas. Entretanto, os resultados obtidos na estabilização de plasmídios em novas linhagens vacinais significam um avanço no teste e uso de tais linhagens no desenvolvimento de vacinas multifatoriais.

ABSTRACT

Salmonellosis and malaria are two infectious diseases of high prevalence in the world, particularly affecting human populations living in underdeveloped regions and countries or developing countries. Despite several efforts, there is not a vaccinal formulation totally effective to control these diseases. This way, our group has sought to enhance the expression of M2 MAEBL's antigen Domain of *Plasmodium yoelii*, which is quite similar to same protein of *P. falciparum*, in attenuated strains of *Salmonella enterica* Typhimurium. In previous studies we found that the expression at low levels was not sufficient to induce a protective immune response. Thus, there was a clear need to improve M2 expression levels in the new strains to be tested. The expression vector previously used was modified, the *m2* sequence was codon-optimized for expression in *Salmonella*, and a periplasmic secretion signal was added at the beginning of the sequence to be expressed. Additionally, new attenuated *S. enterica* strains developed by our group were modified in a way to use them in the expression of heterologous antigens, employing a balanced lethal system (ASD) for expression plasmid stabilization. Despite of the new vectors successfully built as well as codon optimization for *m2* expression, we found a possible deleterious effect of the M2 domain when expressed in large quantities, making it impossible to obtain some planned constructs. However, the results obtained on stabilization of expression vectors in the new vaccine strains are an important advance for the use of such strains as multifactorial vaccines.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMA-1 – Antígeno Apical de Membrana

ASD – Aspartato Aspartato β -Semialdeído Desidrogenase

Bla – Betalactamase

BSA – Albumina Sérica Bovina

CAT – Cloranfenicol Acetil Transferase

cm – Centímetro

CSP – Proteína do Circunsporozoíta

DAP – Ácido Diaminopimélico

DBL – Proteínas tipo *Duffybinding*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxinucleotídeo Trifosfato

DO – Densidade Óptica

DTT – Ditioltreitol

EBA-175 – Proteína de Ligação ao Eritrócito

EBP – Proteínas de Ligação à Eritrócitos

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

FIS – *Factor for Inversion*

FRT – *FLP Recognition Site*

IgG – Imunoglobulina G

IHF – *Integration Host Factor*

Kb - Kilobase

LB – Meio Luria Bertani

LSA3 – Antígeno do Estágio Hepático

MALT – Tecido Linfoide Associado a Mucosas

mG – Miligrama

MgM – Meio Magnésio Mínimo

mL – Mililitro

MSP-1 – Proteína de Superfície do Merozoíto

NAPs – Proteínas Associadas ao Nucleóide

pb – Pares de Bases

PBS – Tampão Salina Fosfato

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PSA – Persulfato de Amônio

RPM – Rotações Por Minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Gel de Eletroforese de Poliacrilamida com Dodecil sulfato de sódio

SOC – Meio “super optimal catabolite repression”

SS – Meio *Salmonella-Shigella*

SSP2 – Proteína da Superfície do Esporozoíto 2

ST – *Salmonella enterica* Typhimurium

STi – *Salmonella enterica* I 4, [5], 12:i:-

TRAP – Proteína Relacionada à Trombospondina

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFP – Unidade Formadora de Placa

UV – Ultravioleta

WHO – *World Health Organization*

°C – Graus Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

µM – Micromolar

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Representação esquemática do sistema λ -Red, proposto por Datsenko e Wanner (2000). (Página 24)

Figura 2: Mutantes *Salmonella enterica* Typhimurium 662 Δ *asd::CAT*. (Página 29)

Figura 3: Amplificação com *primers* AsdDT mostrando a diferença de tamanho da mesma região genômica das linhagens selvagem e mutantes. (Página 30)

Figura 4: Retirada da marca de resistência à cloranfenicol com o plasmídeo pCP20. (Página 31)

Figura 5: Construção do duplo mutante Δ *asd* Δ *ihfA::cat*. (Página 32)

Figura 6: Construção do duplo-mutante Δ *asd* Δ *fis::cat*. (Página 33)

Figura 7: Seqüenciamento do produto de amplificação gerado com *primers* FisDT. (Página 34)

Figura 8: Alinhamento entre a seqüência obtida pelo seqüenciamento e seqüência de 662ST depositada no banco de dados do LGE/Unicamp. (Página 34)

Figura 9: Alinhamento mostrando posição exata onde ocorreu a substituição do gene *fis* pelo gene de resistência ao cloranfenicol, quando comparado ao genoma de *S. enterica* Typhimurim LT2. (Página 35)

Figura 10: Síntese de *m2* otimizado. (Página 37)

Figura 11: Alinhamento das seqüências nativa e otimizada do domínio *m2* de MAEBL. (Página 38)

Figura 12: Mapa do plasmídio pYA3137, mostrando regiões deletadas. (Página 39)

Figura 13: Construção dos plasmídios pYASD e pYD3137. (Página 40)

Figura 14: Construção do vetor de expressão pYDpbm2. (Página 42)

Figura 15: Representação esquemática demonstrando a montagem do vetor pUC18**PpagCblam2. (Página 43)

Figura 16: Representação esquemática demonstrando a montagem do vetor pYDpbm2. (Página 44)

Figura 17: Confirmação da transformação dos mutantes *662ΔasdΔfis::cat* e *662ΔasdΔihfA::cat*, com os plasmídios para expressão de *m2*. (Página 45)

Figura 18: Curva de crescimento das linhagens H683 sem plasmídios, H683 pYA3137 e H683 pYA3137*m2*. (Página 46)

Figura 19: Curva de crescimento das linhagens *662ΔasdΔihfA::cat* contendo os plasmídios pYASD, pYA3137, pYA3137*m2*, pYDpb*m2*. (Página 47)

Figura 20: Curva de crescimento das linhagens H683 pYA3137 comparada a linhagem *662ΔasdΔihfA::cat* pYA3137. (Página 47)

Figura 21: SDS-PAGE dos extratos protéicos das linhagens atenuadas de *S. enterica* transformadas A1 e B1, frações solúveis; A2 e B2 frações insolúveis. (Página 49)

TABELA I: Plasmídios Utilizados. (Página 20)

TABELA II: Primers Utilizados. (Página 21)

TABELA III: Linhagens bacterianas Utilizadas. (Página 21)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Malária.....	1
1.1.1. Dados Gerais da doença	1
1.1.2. Malária e vacinas	4
1.1.3. O antígeno MAEBL	7
1.2. Salmonella	9
1.2.1. Salmonelose.....	9
1.2.2. <i>S. enterica</i> e vacinas	11
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Meios de cultura e condições de cultivo bacteriano.	18
3.2. Métodos moleculares	18
3.3. Linhagens bacterianas, plasmídios e <i>primers</i>	19
3.3.1. Construção dos Mutantes Δasd	22
3.3.2. Construção dos Duplo-Mutantes $\Delta asd \Delta fis::cat$	23
3.3.3. Construção dos plasmídeos e otimização de <i>m2</i>	25
3.4. Sequenciamento de DNA	26
3.5. Análise da expressão de <i>m2</i> em linhagens de <i>S. enterica</i> Typhimurium	26
4. RESULTADOS	29
4.1. Construção das linhagens mutantes	29
4.1.1. Mutantes Δasd	29
4.1.2. Obtenção dos Duplo-Mutantes	31
4.2. Construção dos vetores de expressão	36
4.2.1. Otimização dos códons de <i>m2</i>	36
4.2.2. Deleção dos promotores <i>Pasd</i> e <i>Ptrc</i>	39

4.2.3. Clonagem e montagem dos vetores de expressão	41
4.2.4. Transformação dos duplo-mutantes com os plasmídios de expressão ...	45
4.3. Curvas de crescimento	46
4.4. Análise das proteínas totais das linhagens mutantes transformadas.....	48
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Malária

1.1.1. Dados Gerais da doença

A malária é uma doença que ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, com 109 países classificados como endêmicos ou previamente endêmicos com risco de reintrodução. Epidemias de malária levam à morte em torno de um milhão de pessoas de todas as idades todo ano e são responsáveis por aproximadamente 500 milhões de novos casos anuais. O continente africano, contudo, detém 90% da mortalidade mundial, na sua maioria crianças e gestantes que vivem na África sub-Sahariana, seguida pelo sudeste da Ásia, com 4%. Segundo estimativas da *World Health Organization* (WHO), aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas (quase 50% da população mundial) vivem em áreas com algum risco de transmissão da malária e embora a grande maioria das mortes causadas pela malária ocorra na África, a doença encontra-se amplamente distribuída na América Latina, Sudeste Asiático e Oceania (WHO, 2000; WHO, 2006; WHO, 2010).

No Brasil são registrados aproximadamente 500 mil novos casos por ano, cerca de 95% dos casos, somente na Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins). Apesar de mais de 60% do território nacional apresentar condições favoráveis à incidência de malária, nos estados fora da região Amazônica o risco de transmissão local é pequeno ou inexistente e quase todos os casos registrados são importados da Amazônia legal ou de outros países (Freitas *et al.*, 2007).

Durante décadas a malária vem sendo alvo de intensas campanhas que objetivam a erradicação da transmissão do parasita, através do uso de quimioterápicos, e dos mosquitos vetores, com uso de inseticidas. Em especial para países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento sócio-econômico, esses elevados índices de mortalidade e morbidade causados pela malária são muito prejudiciais e acabam por dificultarem ainda mais o desenvolvimento dessas regiões atingidas (WHO, 2008).

Feachem *et al.* (2010) revisaram que uma estratégia de 3 partes tem sido seguida com o objetivo de erradicar a malária no mundo: (1) controle agressivo em países de alta endemicidade, para conseguir diminuir a transmissão e mortalidade nestes países; (2) eliminação progressiva da malária a partir das margens endêmicas, para encolher o mapa da doença; e (3) Aumentar as pesquisas para desenvolvimento de vacinas e melhores medicamentos, diagnósticos, inseticidas e outras intervenções, e em métodos de entrega que atingem todas as populações de áreas de risco.

A falta de uma vacina eficiente, entretanto, associada ao aumento da resistência de parasitas e mosquitos vetores às drogas e inseticidas tem dificultado o controle desta doença. Durante o ano de 2009 foram, inclusive, relatadas evidências do aumento no número de casos de malária em três países que antes haviam reportado redução no número de casos. As razões para esta ocorrência não são claras, mas deixam evidente a fragilidade dos programas de controle da doença (WHO, 2010).

O ciclo de vida do *Plasmodium* é complexo, porém bem caracterizado, e várias das proteínas diferencialmente expressas em cada estágio da infecção foram determinadas (Florens *et al.*, 2002). O processo de infecção em humanos tem início a partir da entrada de alguns esporozoítos no tecido subcutâneo através da picada do mosquito. Os esporozoítos

atingem a circulação sanguínea e seguem até os hepatócitos, invadindo-os (Mota *et al.*, 2002, Mota e Rodrigues, 2004). A entrada do *Plasmodium* nas células hepáticas conta com a expressão de antígenos específicos, como a proteína do circunsporozoíta (CSP) e a proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP), que medeiam o processo de invasão (Silvie *et al.*, 2003). Dentro dos hepatócitos o *Plasmodium* se desenvolve em esquizontes, que contém os merozoítos. Os merozoítos são liberados no sangue e invadem os eritrócitos, iniciando o estágio sanguíneo. O processo de invasão envolve diferentes mecanismos e várias moléculas da superfície do parasita, como a proteína de ligação ao eritrócito (EBA-175), o antígeno apical de membrana (AMA-1) e a proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP-1), que se ligam a diversos receptores na superfície do eritrócito. Dentro das hemácias, cada merozoíto se desenvolve-se a trofozoíto, gerando um esquizonte na sequencia, e que após completar sua maturação gera mais de 32 merozoítos. Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea onde infectam outras hemácias, mantendo o ciclo e causando os sintomas clínicos da doença (Collins *et al.*, 2009). Alguns merozoítos se diferenciam em células reprodutivas masculinas e femininas, os gametócitos, que são adquiridas por mosquitos do gênero *Anopheles*, quando este se alimenta do sangue humano. No intestino do mosquito, ocorre a fertilização dos gametócitos femininos e a geração de novos esporozoítos, que alcançam a glândula salivar onde maturam e completam o ciclo de vida do parasita, estando prontos para nova infecção no hospedeiro humano (Carvalho *et al.*, 2002).

Graças ao uso das ferramentas hoje existentes, a prevenção e o tratamento desta doença têm melhorado significativamente. Entretanto, estratégias adicionais ou alternativas como o desenvolvimento de uma vacina e a identificação de novos alvos no parasita para

intervenções quimioterapêuticas são medidas de extrema importância para que a eliminação da malária seja alcançada (Collins *et al.*, 2009).

1.1.2. Malária e vacinas

O desenvolvimento de uma vacina mais eficaz contra a malária poderia prover um novo mecanismo para o controle desta doença, entretanto as tentativas de obtenção de preparações vacinais eficientes contra esta enfermidade tem sido marcada por muitas falhas, mas também alguns sucessos encorajadores (Kappe e Mikolajczak, 2011).

Análises experimentais sugerem que a indução de imunidade protetora contra malária pode ser um objetivo tangível. Epstein *et al.* (2011) mostraram que uma preparação injetável de esporozoítos atenuados é capaz de induzir proteção em humanos, apesar desta proteção ainda ser subótima. Seus estudos se estenderam ao modelo animal e demonstraram que esporozoítos atenuados, purificados e criopreservados foram potentes indutores de resposta imune em primatas não humanos e em camundongos utilizando-se de vias específicas de inoculação. Outros trabalhos de igual importância já haviam relatado esta possibilidade (Nusseenzweig *et al.*, 1967; Rieckmann *et al.*, 1979; Collins e Contacos, 1972);

Sabe-se que indivíduos infectados continuamente pelo parasita desenvolvem gradualmente uma imunidade natural, porém de curta duração e cepa-específica (Baird *et al.*, 1991); e que a transferência passiva do soro de pacientes “imunes” induz proteção em crianças infectadas (Sabchaeron *et al.*, 1991). Contudo, o desenvolvimento de uma vacina experimental contra a malária esbarra em algumas dificuldades, essencialmente impostas

pelo complexo ciclo de vida do *Plasmodium spp* e pelo estabelecimento de complexas interações com o hospedeiro (Carvalho *et al.*, 2002). Cada estágio do desenvolvimento do parasita é caracterizado pela expressão de diferentes grupos de antígenos. Mais ainda, para algumas proteínas, existem diferentes grupos de genes produzindo variantes protéicas que podem ser sequencialmente expressas durante a infecção em resposta a pressão imune, o que torna muito difícil induzir uma imunidade estágio-específica capaz de neutralizar outros estágios do parasita (Florens *et al.*, 2002).

Por essas razões, a limitação fundamental do desafio de desenvolver uma vacina contra malária é a identificação de um antígeno que além de imunogênico seja, principalmente, protetor (Matuschewski e Mueller, 2007). Sendo assim, diferentes antígenos vêm sendo identificados e isolados de diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium spp* e utilizados como base em vacinas de subunidades contra a malária. A maior parte destas vacinas experimentais utiliza antígenos expressos na fase pré-eritrocítica, visando impedir a infecção do hospedeiro e o futuro aparecimento dos sintomas clínicos. Antígenos como o antígeno do estágio hepático 3 (LSA3), a proteína da superfície do esporozoíto 2 (SSP2) ou TRAP (Webster e Hill, 2003) e CSP já foram descritos como base em vacinas experimentais, entretanto, apresentaram sucesso limitado (Moorthy *et al.*, 2004a; 2004b). Algumas destas proteínas, inclusive, já foram utilizadas em sistemas análogos ao que é testado neste trabalho, utilizando-se de bactérias atenuadas expressando estes antígenos, algumas vezes fusionadas ao gene da flagelina *fliC* (McKelvie *et al.*, 2008; Bargieri *et al.*, 2011)

Uma vacina experimental efetiva que atue na fase eritrocítica do ciclo seria fundamental pois impediria a infecção de hemácias sadias e inibiria o sequestro do parasita

nos microcapilares, levando a atenuação de sintomas clínicos e reduzindo as chances de complicações e as taxas de mortalidade. A maioria das vacinas estudadas capazes de atuar contra estágios sanguíneos do parasita baseia-se em antígenos de superfície responsáveis pela invasão de hemácias saudáveis, que servem como ligantes do parasita a essas células. Neste sentido, MSP-1 é o antígeno envolvido na invasão de eritrócitos mais bem caracterizado. Estudos clínicos em dois diferentes países africanos revelaram que a presença de anticorpos contra o fragmento de 19 kDa na porção carboxi-terminal da molécula de MSP1 de *P. falciparum* (PfMSP1) estava associada a diminuição dos sintomas clínicos da doença (Egan *et al.*, 1999). Entretanto, alguns dos pacientes imunizados apresentaram reações de hipersensibilidade após várias doses (revisado por Webster e Hill, 2003), mostrando a necessidade de buscar formulações alternativas.

Outra molécula que também tem sido considerada como candidata a vacina contra o estágio eritrocítico é AMA-1, por ser relativamente conservada entre diferentes espécies, e pelo fato de que anticorpos humanos capazes de reconhecer este antígeno inibem a invasão de eritrócitos saudáveis por merozoítas livres (Holder *et al.*, 2001).

Apesar de inúmeros esforços, até agora somente a RTS,S/AS02A, uma vacina pré-eritrocítica que tem como alvo a CSP, tem sido demonstrado uma eficácia protetora significativa em estudos de desafio e ensaios clínicos em países onde a malária é endêmica (revisado por Bojang, 2006). O recente sucesso da fase IIb de ensaios clínicos demonstrou que RTS,S é capaz de reduzir a malária clínica em 55% e a malária grave em 35% (Alonso *et al.*, 2004; Kappe e Mikolajczak, 2011) e tornou essa vacina a mais promissora candidata para o uso na imunoprevenção da doença. Esses resultados indicam que é possível obter uma

vacina efetiva contra a malária baseada em sequências peptídicas derivadas de proteínas com papel relevante na infecção de células hospedeiras pelo *Plasmodium spp*, entretanto a forma de apresentação desses epítomos acaba por ser um dos gargalos mais limitantes para se chegar a uma vacina satisfatória (Bargieri *et al.*, 2011).

1.1.3. O antígeno MAEBL

Kappe e colaboradores (1997; 1998) caracterizaram um antígeno de aproximadamente 200 kDa de *Plasmodium yoelii* e *Plasmodium berghei* como parte integrante da família de proteínas de ligação do parasita ao eritrócito (EBP). Este antígeno denominado MAEBL possui domínios de duas famílias protéicas presentes em organelas situadas na região apical de merozoítas e relacionadas com a infectividade do parasita (Noe e Adams, 1998; Preiser *et al.*, 2000; Blackman e Bannister, 2001).

O gene *maebl* de *P. yoelii* e *P. berghei* é composto de uma única cópia e possui uma estrutura de vários exons, cada exon representando um domínio funcional. O éxon 1 codifica o peptídeo sinal da molécula; o exon 2 os domínios M1 e M2, similares aos domínios ricos em cisteína de AMA-1, uma região repetitiva e uma região carboxil também rica em cisteínas com grande homologia a proteínas de ligação ao eritrócito tipo *Duffybinding* EBP-DBL; o exon 3 uma região transmembrânica; enquanto que o quarto e quinto exon codificam uma cauda citoplasmática (Kappe *et al.*, 1998).

Os domínios M1 e M2 do antígeno MAEBL de *P. yoelii* foram identificados como os responsáveis pela ligação desta molécula a superfície dos eritrócitos. Considerou-se que tal propriedade adesiva seria similar àquela observada pelos antígenos DBL de *P. vivax*, *P.*

knowlesi e *P. falciparum* (Adamns *et al.*, 2001). Os motivos presentes no antígeno MAEBL de *P. falciparum* que apresentam esta capacidade adesiva foram recentemente descobertos utilizando peptídeos correspondentes a diferentes porções dos domínios M1 e M2 (Ocampo *et al.*, 2004). Este mesmo trabalho demonstrou a capacidade de alguns destes peptídeos em inibirem a invasão de merozoítas de *P. falciparum*. Além disso revelou a existência de dois motivos de adesão no domínio M1 e cinco no domínio M2, sugerindo que o domínio M2 seja o principal responsável pela capacidade adesiva da molécula.

O antígeno MAEBL foi descrito primeiramente em merozoítas sanguíneos, mas a expressão desta molécula também foi observada em esporozoítas de *P. yoelii*, *P. berghei* e *P. falciparum* coletados a partir de glândulas salivares de mosquitos infectados (Kappe *et al.*, 2001; Kariu *et al.*, 2002; Ghai *et al.*, 2002). Em experimentos utilizando mutantes nulos para MAEBL, constatou-se que esta proteína é essencial para a infecção dos esporozoítas nas glândulas salivares do mosquito vetor, sugerindo sua implicação na migração do esporozoíta na glândula salivar (Kariu *et al.*, 2002, Saenz *et al.*, 2008).

Preiser e colaboradores (2004) mostraram que MAEBL é expresso de maneira diferenciada em esporozoítas da glândula salivar e em esporozoítas presentes no intestino do inseto vetor. Além disto, estes autores demonstram que anticorpos capazes de reconhecer o antígeno MAEBL de *P. yoelii*, também inibem o desenvolvimento do parasita em culturas primárias de hepatócitos infectados por esporozoítas. Estes dados sugerem fortemente a participação desta proteína também no desenvolvimento do estágio hepático no hospedeiro vertebrado.

A presença de MAEBL, tanto no estágio de merozoíta quanto no estágio de esporozoíta do parasita, abre perspectivas para sua utilização em uma vacina, como alvo de uma resposta imune mais abrangente e eficaz.

1.2. Salmonella

1.2.1. Salmonelose

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae que agrupa bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores e geralmente flagelados (Mastroeni e Maskell, 2006). Popoff e colaboradores (2004), utilizando-se de técnicas de biologia molecular associada a testes bioquímicos, realizaram uma análise taxonômica mais apurada, agrupando todas as sorovariedades em duas espécies: *S. enterica*, subdividida em seis subespécies ou grupos (*enterica* – grupo I, *salamae* – grupo II, *arizonae* – grupo IIIa, *diarizonae* – grupo IIIb, *houtenae* – grupo V, *indica* – grupo VI) e *S. Bongori*.

A incidência da salmonelose é maior em crianças menores de cinco anos e em adultos com mais de 60 anos de idade. As fontes mais comuns de infecção são produtos derivados das aves domésticas, de carne suína ou bovina, chocolate e de alimentos preparados em superfícies mal higienizadas (Jay, 2000).

As sorovariedades de *S. enterica* patogênicas causam, em mamíferos, infecções com diferentes graus de gravidade que variam desde gastroenterites localizadas na mucosa intestinal até infecções sistêmicas graves. A virulência está relacionada ao tipo de sorovar bacteriano, o tipo de hospedeiro envolvido e das condições da microbiota intestinal dos hospedeiros. A sorovariedade Typhi causa, em humanos, a febre tifóide, uma infecção sistêmica grave. Em suínos e bovinos os principais agentes etiológicos responsáveis por

septicemia são, respectivamente, *S. enterica* Choleraesuis e *S. enterica* Dublin. Embora essas sorovariedades acometam esses animais, elas também podem causar infecções graves no homem (Mastroeni e Maskell, 2006).

A organização mundial de Saúde estima a ocorrência de 16 a 33 milhões de casos de febre tifóide no mundo, com 500 a 600 mil fatalidades anuais (Who, 2008). O número de casos de infecções causadas por outras sorovariedades é ainda maior, mas não existem dados precisos sobre a incidência destas infecções.

No Brasil, os dados sobre infecções por *S. enterica* são provavelmente incompletos, uma vez que a notificação de infecções alimentares não é obrigatória, mas devido às precárias condições de saneamento básico em algumas regiões, acredita-se que seja um dos principais problemas de saúde no país (Hofer e Dos Reis, 1994).

Durante o período de 1996-2003, em diferentes localizações geográficas de todo o Estado de São Paulo, foram isoladas de humanos, 3554 amostras de *Salmonella* classificadas em 68 sorovares diferentes. Durante os oito anos de estudo, os sorovares mais encontrados, em ordem de classificação foram Enteritidis, Typhimurium, 4,[5],12:i:-, Typhi e Dublin, perfazendo um total de 84.1% de todas as amostras isoladas (Fernandes *et al.*, 2006).

Salmonela não-Typhi são hoje os isolados mais comuns em culturas sanguíneas de diversas partes da África, compreendendo por volta de 50% dos casos relatados de bacteremia e estando associada a quase 20% dos casos fatais de salmonelose (MacLennan, 2012). A distribuição de bacteremia causada por salmonela não-Typhi em crianças africanas acompanha precisamente a prevalência de malária nestas regiões (Andrews-Polymenis *et al.*, 2010).

Muitos destes casos fatais se devem ao alto índice de malária na região. A infecção por *Plasmodium* implica em um aumento da suscetibilidade do hospedeiro a infecções sistêmicas por salmonela não-Typhi, levando a um quadro de septicemia, cujos sintomas muitas vezes ficam mascarados devido à febre causada pela malária. Apesar desta correlação já ser conhecida desde 1920, apenas recentemente foram elucidados os mecanismos que levam ao aumento da suscetibilidade à salmonela não-Typhi por indivíduos com malária. Esses novos resultados podem ter implicações importantes na forma de ação que futuras vacinas contra malária devam exercer, tentando minimizar possíveis aumentos de susceptibilidade contra salmonela não-Typhi (Cunnington *et al.*, 2012).

1.2.2. *S. enterica* e vacinas

A linhagem Ty21a compõe a única vacina viva atenuada contra a febre tifóide licenciada para uso em humanos, comercializada com o nome de Vivitof pela Bernabiotech Ltd da Suíça. Esta vacina oral é segura, mas devido a sua grande atenuação, requer várias doses para induzir imunidade, que freqüentemente é de curta duração. Além disso, as causas da atenuação não estão totalmente elucidadas, uma lacuna pouco desejável para uma linhagem vacinal (Guzman *et al.*, 2006).

Os resultados alcançados com a linhagem Ty21a levaram outros grupos a construir novas linhagens vacinais de *S. enterica*, contendo deleções em genes específicos que atenuaram a virulência. Adicionalmente, essas linhagens apresentam uma característica fundamental para vacinas vivas, a estabilidade da atenuação, uma vez que a mesma foi alcançada por deleção de um ou mais genes. Esses mutantes foram construídos

inicialmente em *S. enterica* Typhimurium, devido à disponibilidade do modelo murino de infecção, sendo as mutações promissoras transferidas para linhagens de *S. enterica* Typhi, muitas vezes a própria Ty2 (Galen *et al.*, 2009; Guzman *et al.*, 2006).

S. enterica é um excelente carreador de antígenos devido a sua capacidade de invadir, sobreviver e proliferar no interior de macrófagos, polimorfonucleares e células dendríticas. Graças a sua capacidade de invasão e colonização de tecidos linfóides associados a mucosas (MALT), aliada à disponibilidade de mutantes atenuados com capacidade de invasão e colonização pouco afetadas, *S. enterica* tem se mostrado uma excelente carreadora de antígenos. Assim, linhagens atenuadas de *S. enterica* podem ser manipuladas geneticamente de tal forma a expressar antígenos heterólogos, tornando possível a obtenção de linhagens vacinais multifatoriais (Curtiss III *et al.*, 2010, Cheminay e Hensel, 2008).

Diferentes antígenos derivados de outras bactérias, vírus, fungos, parasitas e mesmo de células de mamífero foram expressos em linhagens vacinais de *S. enterica*. Estas linhagens foram capazes de induzir resposta imune protetora não somente contra a salmonelose, mas também contra o organismo doador do antígeno heterólogo (Atkins *et al.*, 2006; Cheminay e Hensel, 2007; Kwon *et al.*, 2007; Loessner *et al.*, 2007; Mahoney *et al.*, 2007; Bueno *et al.*, 2009; Galen *et al.*, 2009; Hussein e Hensel, 2005; Oliveira *et al.*, 2007, Oliveira *et al.*, 2010). Uma característica fundamental de tais linhagens é, além da impossibilidade de reversão da atenuação, a capacidade de expressar o antígeno heterólogo de forma estável e em quantidades suficientes para induzir o sistema imune.

Graças às novas técnicas de mutação, como o sistema λ -red (Datsenko e Wanner, 2000), a estabilidade das novas linhagens atenuadas é muito grande, devido à deleção de

dois ou mais genes específicos inteiros. Muito diferente das primeiras linhagens atenuadas construídas a partir de tratamentos com agentes mutagênicos, que não impossibilitavam totalmente a reversão da mutação (Cheminay e Hensel, 2008).

Uma das abordagens que vem sendo muito explorada por nosso grupo é a construção de mutantes nulos para proteínas associadas ao nucleóide (NAPs). Uma das vantagens da utilização destes genes para a construção de mutantes nas linhagens vacinais é que eles afetam diferentes aspectos do fenótipo da bactéria que pode reduzir sua virulência (Mangan *et al.* 2006; Mangan *et al.*, 2011).

Dentre os mutantes testados por nosso grupo quanto à atenuação e capacidade de ativação de resposta imune destacam-se os mutantes para a proteína IHF (*Integration host factor*) e FIS (*Factor for inversion*). Estes mutantes têm demonstrado bons níveis de atenuação e grande capacidade de estimulação do sistema imune.

A proteína IHF é um heterodímero composto pelas subunidades α (IHF- α) e β (IHF- β) que impõe ao DNA curvaturas de aproximadamente 180° (Lorenz *et al.*, 1999), sendo essa atividade capaz de induzir importantes alterações topológicas no DNA (Dorman, 2009; Thanbichler *et al.*, 2005), modulando a expressão de vários genes, assim como outros eventos celulares (Dorman, 2009; Goosen e van de Putte, 1995). FIS, por sua vez, participa na ativação da expressão de genes envolvidos na maquinaria de tradução, tais como operons de RNA e de fatores de tradução (Thanbichler *et al.*, 2005), na expressão de genes associados à patogenicidade, assim como genes de manutenção (Kelly *et al.*, 2004, Dillon e Dorman, 2010). Estes mutantes, contudo, não haviam até então sido testados quanto a sua

capacidade de manterem plasmídios de expressão sem marcas de resistência a antibióticos de forma estável, nem quanto a sua capacidade de expressar antígenos heterólogos.

No início, a clonagem e expressão de antígenos em *S. enterica* eram alcançadas através da utilização de plasmídios carregando genes de resistência a antibióticos (Cárdenas e Clements, 1992). Alguns estudos demonstraram, no entanto, que na ausência de pressões seletivas, tais plasmídios eram instáveis e, portanto, perdidos após poucos ciclos de replicação *in vivo* (Cárdenas e Clements, 1992; Dunstan *et al.*, 2003) ou até mesmo durante o cultivo *in vitro* (Everest *et al.*, 1995). Além disso, o uso de plasmídios carreadores que conferissem resistência a antibióticos seria inaceitável por questões de segurança (Curtiss III *et al.*, 2010).

Para resolver tais problemas, estratégias como a utilização de promotores induzidos *in vivo* no controle de expressão do antígeno (Cheminay e Hensel, 2007; Marshall *et al.*, 2000) a construção de sistemas letais balanceados (Curtiss *et al.*, 1989; Everest *et al.*, 1995) ou a integração do gene heterólogo no cromossomo de *S. enterica* (Hone *et al.*, 1988; Strugnell *et al.*, 1990; Everest *et al.*, 1995; Hussein e Hensel, 2009) foram descritos.

O sistema letal-balanceado, proposto por Galán e colaboradores (1990), baseia-se na deleção de um gene indispensável ao crescimento bacteriano, e a complementação deste gene em um plasmídio. O gene de escolha foi o *asd*, que codifica para a enzima Aspartato β -Semialdeído Desidrogenase (Asd), responsável pela síntese de Ácido Diaminopimélico (DAP), um importante componente da parede celular bacteriana não disponível nos hospedeiros de salmonela. Desta forma, a perda do plasmídio pela bactéria implicaria na desestruturação da parede celular e em sua morte, devido à falta de DAP.

Este sistema, a princípio, foi feito clonando-se todo o gene *asd* deletado, incluindo sua região promotora (Galán *et al.*, 1990). Entretanto a expressão muito aumentada da proteína Asd, principalmente em plasmídios com número muito alto de cópias, levava a uma maior atenuação e perda da capacidade de colonização, implicando em diminuição de imunogenicidade. Para solucionar este problema Kang e colaboradores (2002) criaram novos plasmídios contendo apenas a sequência shine-dalgarno e a região codificante da proteína Asd. Estes novos plasmídios permitiam a sobrevivência da bactéria com os níveis da proteína Asd próximos do observado em linhagens selvagens, melhorando a colonização e, conseqüentemente, a resposta imune.

Outro fator determinante para uma boa resposta imune são os níveis de expressão do antígeno heterólogo. Níveis altos de expressão são necessários para uma boa resposta imune, mas podem comprometer a viabilidade celular, levando a um aumento indesejado da atenuação (Pathangey *et al.*, 2009). Devido a isso, muitos trabalhos têm proposto a utilização de sistemas de regulação de expressão, ou promotores induzíveis *in vivo* (Wang *et al.*, 2010; Dunstan, *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 2009; McKelvi *et al.*, 2004). Estes sistemas possuem a vantagem de não serem comprometidos com a expressão do antígeno heterólogo durante o cultivo *in vitro*, e, portanto, não sofrem diminuição de sua capacidade invasora, promovendo melhor resposta imune.

Muitos promotores indutíveis *in vitro* têm sido comparados quanto a sua capacidade de expressar antígenos de forma eficiente, mas apenas quando *in vivo*. Um dos promotores que se destacam é o promotor do gene *pagC*. Este gene codifica para uma proteína de membrana externa, importante para a sobrevivência em macrófagos, e sua expressão é

regulada pelo sistema de dois componentes phoP/phoQ, ativado em baixas concentrações de magnésio. (Brandão, 2002; Wang *et al.*, 2011)

Nosso grupo vem trabalhando no desenvolvimento de preparações vacinais que utilizam *S. enterica* atenuada como carreador (Covone *et al.*, 1998; Brocchi *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2007). Recentemente, demonstramos que linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium H683 (Galán *et al.*, 1990) expressando o domínio M2 de MAEBL foi capaz de induzir resposta imune específica contra este domínio proteico. Os anticorpos foram capazes de reconhecer a proteína nativa. No entanto, não foi observada proteção no modelo murino de infecção por *P. yoelii*, após a imunização de camundongos BALB/c com duas doses orais da linhagem vacinal (dados prévios não publicados). De fato, resultados do laboratório do Prof. Fabio Trindade Maranhão Costa, nosso colaborador, indicam que são necessárias várias doses da proteína purificada recombinante para induzir proteção. Com isso, nossos esforços têm se concentrado em conseguir melhorar os níveis de expressão deste antígeno heterólogo, assim como a forma de apresentação deste antígeno.

2. OBJETIVOS

O presente estudo visou o desenvolvimento de linhagens vacinais de *S. enterica* recombinantes, produtoras do domínio M2 do antígeno MAEBL de Plasmodium, utilizando novas linhagens recombinantes e novos sistemas de expressão deste antígeno.

2.1. Objetivos específicos

- Construir um gene artificial contendo toda a extensão do domínio M2 de MAEBL com *codons* otimizados para expressão em *S. enterica*;
- Construir de um sistema de expressão do domínio M2 de MAEBL em linhagens de *S. enterica* atenuadas, utilizando o promotor regulado *PpagC*, induzível *in vivo* e no ambiente intracelular;
- Construir um sistema para a localização periplasmática do domínio M2 em *S. enterica*;
- Modificar mutantes de *S. enterica* Typhimurium atenuados, desenvolvidos previamente por nosso grupo, de forma a expressar o domínio M2 da proteína MAEBL utilizando o sistema letal-balanceado/*Asd* de estabilização;
- Avaliar os níveis de expressão do domínio M2 quando expresso *in vitro* sob controle de diferentes regiões promotoras, em diferentes linhagens de *S. enterica* Typhimurium;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meios de cultura e condições de cultivo bacteriano.

Os meios de cultura rotineiramente utilizados foram LB ou LB-Ágar (Sambrook e Russell, 2001), ágar MacConKey (Difco) e Salmonella-Shigella Agar (Difco). Os antibióticos cloranfenicol e ampicilina, quando requeridos, foram utilizados nas concentrações de 25µg/mL e 100µg/mL respectivamente, conforme Sambrook e Russell (2001). O DAP (Sigma-Aldrich, St.Louis- MO, USA) foi utilizado na concentração final de 50µg/mL para o crescimento das linhagens *Δasd*, auxotróficas para este composto. As culturas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas em estufa. Culturas líquidas foram crescidas sob agitação (200rpm) para a aeração.

Para as curvas de crescimento das linhagens contendo o plasmídio pYDpbm2 foi necessária a adição de MgCl₂ ao meio de cultura do pré-inóculo, pois quando este não foi adicionado, as células reinoculadas não apresentavam crescimento. Da mesma forma para o pré-inóculo para ensaios de ativação de M2.

Os ensaios de expressão de M2 foram feitos em meio MgM (Beuzón *et al.*, 1999). Este meio foi modificado, de forma a conter 100mM de Tris-Cl, pH 7,4, 5mM de KCl, 7,5mM de (NH₄)₂SO₄, 0,5mM K₂SO₄, 1mM KH₂PO₄, 8mM MgCl₂, 0,4% de Glicose e 0,1% de casaminoácidos.

3.2. Métodos moleculares

As metodologias para amplificação de seqüências de DNA por PCR, extração plasmidial, purificação de fragmentos de DNA, digestão com enzimas de restrição e

clonagem molecular foram realizadas conforme descritas em Sambrook e Russell (2001) e Ausubel *et al.* (2003). A eletroforese em gel de agarose foi realizada conforme descrito previamente (Sambrook e Russell, 2001). Após a corrida, o DNA no gel foi corado em solução de Gel-RedTM seguindo instruções do fabricante (Biotium – Hayward, USA) e o DNA visualizado em transiluminador de UV, sendo os resultados registrados com o fotodocumentador Gel Logic 212 Pro (Carestream Molecular Imaging – New Haven, USA)

A purificação de plasmídios foi realizada utilizando-se os kit Perfectprep® Plasmid Midi (Eppendorf – Hamburg, Germany) e Illustra Mini-spin Plasmid prep. (GE healthcare – Buckinghamshire, UK), seguindo-se a metodologia descrita pelos fabricantes.

A introdução de plasmídios recombinantes em células bacterianas foi realizada por eletroporação. As metodologias utilizadas no preparo das células e nos procedimentos de transformação e eletroporação foram as descritas previamente (Sambrook e Russell, 2001; Ausubel *et al.*, 2003).

3.3. Linhagens bacterianas, plasmídios e *primers*.

Todas as linhagens bacterianas utilizadas neste estudo estão descritas na tabela III. As linhagens de *E. coli* foram utilizadas para fazer as clonagens e montagens dos vetores de expressão, com exceção da linhagem C41(DE3) utilizada para a expressão do domínio M2 a partir do vetor pET28aM2. A linhagem χ 6212 foi utilizada para a montagem dos vetores pertencentes ao sistema letal balanceado, pois deriva da DH5 α com deleção do gene *asd*, e possui alta frequência de transformação. A linhagem DH10 β foi utilizada para as clonagens no vetor pUC18***PpagC*, e BW25141 foi utilizada para a manutenção do plasmídio pKD3, pertencente ao sistema de recombinação λ -Red.

As Linhagens de *Salmonella* foram utilizadas para a obtenção das linhagens mutantes e para a expressão do domínio M2, com exceção da linhagem MST1761, utilizada para a propagação de altos títulos do fago P22HT.

Os *primers* utilizados no estudo se encontram na Tabela II, e foram sintetizados por *Integrated DNA Technologies* (USA), assim como os plasmídios utilizados estão sumarizados na Tabela I.

TABELA I: Plasmídios Utilizados

Plasmídios	Características	Referência
pYA3137	Plasmídeos Asd ⁺ , Ori pUC18	Galán (1990)
pYA3137trcm2	Asd ⁺ , plasmídio pYA3137trc contendo o gene <i>m2</i> de <i>P.yoelii</i> clonado.	Franzin (2009)
pYASD	pYA3137 modificado para retirada do promotor do gene <i>asd</i>	Este Estudo
pYD3137	pYASD modificado para retirada do promotor <i>P_{trc}</i> mantendo shine-dalgarno	Este Estudo
pYDpbm2	pYD3137 com Bla- <i>m2</i> clonados junto ao promotor <i>P_{pagC}</i>	Este Estudo
pUC18** <i>P_{pagC}</i>	pUC18 modificado e com promotor <i>P_{pagC}</i> clonado	Brandão (2002)
pGEM-T®	Amp ^r , plasmídio de clonagem de produtos de PCR.	Promega Corporation
pET28am2	Plasmídio de expressão pET28a com domínio <i>m2</i> clonado	Costa <i>et al.</i> , np
pSMARTblam2	Amp ^r , <i>m2</i> otimizado fusionado ao sinal de secreção da betalactamase	Este Estudo
pKD3	Amp ^r , Cm ^r , acessório do sistema λ Red para amplificação de <i>cat</i>	Datsenko e Wanner (2000)
pKD46	Amp ^r , Cm ^r , expressa γ , β e <i>exo</i> , acessório do sistema λ Red	Datsenko e Wanner (2000)
pCP20	Amp ^r , Cm ^r , sensível a temperatura, acessório do sistema λ Red	Datsenko e Wanner (2000)

Amp^r: Resistente a ampicilina, Asd⁺: Contém o gene *asd*, Cm^r: resistência ao Cloranfenicol, *cat*: cloranfenicol acetil transferase

TABELA II: Primers Utilizados

Primer	Sequência 5'-3'	Referência
Asd-F	ACAGAACCACACGCGAGGCCCGATAAGCGCTGCAATA	Martinez et al., Np
Asd-R	CGCGCATACACAGCACATCTCTTTGCAGGAAAAAAA	Martinez et al., Np
AsdDT-F	TATCCGGCCTACAGAACCCAC	Martinez et al., Np
AsdDT-R	GCGCATACACAGCACATCTC	Martinez et al., Np
FisDT-F	GAACAGCTGGAGGCGTTG	Martinez et al., Np
FisDT-R	GACCAAATTCATGTGATGC	Martinez et al., Np
pYA3137/ <i>asd</i> -F	GCGGCGCGGCCGCGCACATCTCTTTGCAGG	Este estudo
pYA3137/ <i>asd</i> -R	GCGGCGCGGCCGCGTTTGCAGGCAATGGAAC	Este estudo
pYA3137/ <i>trc</i> -F	GACCATGCCGGAATTCGCA	Este estudo
pYA3137/ <i>trc</i> -R	GCGGCGAATTCGGTGACGATGCACCCCT	Este estudo
M2_NdeI/HindIII-F	GCGGCCATATGCTGAACAAATACATGAAATCCAAC	Este estudo
M2_NdeI/HindIII-R	GCGGCAAGCTTTTACATTTTGGATTTCGTCGG	Este estudo
M2_BamHI/SalI-F	GCGGCGGATCCATGCTGAACAAATACATGAAATCCAAC	Este estudo
M2_BamHI/SalI-R	GCGGCGTCGACTTACATTTTGGATTTCGTCGG	Este estudo

Amp^r: Resistente a ampicilina, Asd⁺: Contém o gene *asd*, Cm^r: resistência ao Cloranfenicol, *cat*: cloranfenicol acetil transferase

TABELA III: Linhagens bacterianas Utilizadas

Bactéria	Genótipo	Referência
<i>E. coli</i>		
χ6212	F'endA1 <i>hsdR</i> 17(r _k - m _k +) <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>recA</i> 1 <i>gyrA</i> (Nal ^r)	Nakayama <i>et al.</i> (1988)
BW25141	<i>relA</i> 1 Δ(<i>lac</i> ZYA- <i>argF</i>)U169 <i>deoR</i> (φ80 <i>diac</i> Δ(<i>lacZ</i>) M15) Δ <i>asd</i> <i>lacI</i> q <i>rrnBT</i> 14 <i>DlacZ</i> WJ16 <i>DphoBR</i> 580 <i>hsdR</i> 514 <i>DaraBADAH</i> 33 <i>DrhaBADLD</i> 78 <i>galU</i> 95 <i>end</i> - ABT333 <i>uidA</i> (DMluI):: <i>pir</i> 1 <i>recA</i> 1	Datsenko e Wanner (2000)
DH10β	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>recA</i> 1 <i>endA</i> 1 <i>araD</i> 139 Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ- <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	Invitrogen®
C41 (de3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Miroux e Walker (1996)
<i>S. enterica</i>		
H683	Δ <i>aroA</i> Δ <i>aroD</i> Δ <i>asdA</i> 1	Galán <i>et al.</i> (1990)
662ST	<i>S. enterica</i> Typhimurium Selvagem	Coleção do Laboratório
607STi	<i>S. enterica</i> Typhimurium I 4,5,12:i:- Selvagem	Coleção do Laboratório
662ST	662ST contendo o plasmídio pKD46	Este trabalho
pKD46		
607STi	607STi contendo o plasmídio pKD46	Este trabalho
pKD46		
LGBM1	Δ <i>ihfA</i> :: <i>cat</i>	Martinez et al., Np
LGBM2	Δ <i>fis</i> :: <i>cat</i>	Martinez et al., Np
LGBM5	Δ <i>asd</i>	Este trabalho
LGBM3	Δ <i>ihfA</i> :: <i>cat</i> Δ <i>asd</i>	Damiani 2011, np
LGBM4	Δ <i>fis</i> :: <i>cat</i> Δ <i>asd</i>	Este trabalho
MST1761	<i>leuA</i> 414(Am) <i>hsdL</i> (r-m ⁺) <i>Fel</i> 2 ⁻ <i>supE</i> 40	Maloy, (1996)

Np: não publicado.

3.3.1. Construção dos Mutantes Δasd

A construção de mutantes foi feita seguindo a técnica λ Red, descrita por Datsenko e Wanner (2000). Transformantes carreando o plasmídio pKD46, obtidos a partir da transformação das linhagens selvagens 662ST e 607STi com este plasmídio, foram inoculados em 3mL de LB contendo ampicilina (100 μ g/ml) e crescidos durante a noite à 30°C. A quantidade de 500 μ L da suspensão celular foi reinoculada e crescida em 50mL de LB pré aquecido à 30°C contendo ampicilina (100 μ g/ml) e arabinose (50mM) – para ativação da expressão dos genes acessórios λ -Red – até atingir D.O. 0,6. A partir deste ponto, as células foram resfriadas a 4°C e lavadas 3 vezes em Glicerol 10% gelado, para indução de eletrocompetência, como descrito por Sambrook e Russel (2001), e ressuspendidos, por fim, em 250 μ L de glicerol 10%. Produtos de PCR, amplificados utilizando-se dos *primers* Asd-F e Asd-R e o plasmídio pKD3 como molde, foram purificados em coluna de purificação de fragmentos de produtos de PCR (Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit – GE Healthcare) e digeridos com DpnI (20 unidades, 37°C/1 hora). O produto de digestão foi dialisado em membrana de 0,025 μ m (Millipore) e, após a diálise, usou-se 10-100 μ g para eletroporar as células contendo o plasmídio pKD46 eletrocompetentes. Após a eletroporação as células foram ressuspendidas em meio SOC ou LB pré-aquecidos a 37°C por 1 hora e plaqueadas, após esse período, em meio LB acrescido de Cloranfenicol (25 μ g/mL) e Ácido Diaminopimélico (DAP) (50 μ g/mL). A confirmação da substituição gênica foi feita por PCR utilizando-se dos *primers* AsdDT, que anelam em regiões que flanqueiam o gene *asd*, além da análise de fenótipo em meio SS acrescido e não acrescido com DAP.

Após a confirmação, a mutação foi transferida por transdução generalizada via fago P22HT (protocolo de transdução detalhado mais a frente) para linhagens selvagens 662ST e 607STi, e novamente confirmadas, por PCR e por plaqueamento. Após a confirmação, estas linhagens foram novamente crescidas e lavadas com glicerol 10% para indução de eletrocompetência, e eletroporadas com o plasmídio pCP20 para retirada da marca de resistência *cat*. Após a eletroporação, as células foram plaqueadas em LB acrescido de ampicilina (100µg/ml) e crescidas durante a noite à 30°C. Em seguida colônias isoladas foram repassadas para uma placa *master* e crescidas à 43°C para eliminação do plasmídio pCP20. As colônias da placa *master* foram testadas quanto à resistência, plaqueando-se em placas de SS com e sem ampicilina e com e sem cloranfenicol. Apenas as que não apresentaram crescimento na presença de nenhum dos dois antibióticos foram selecionadas e foi feito um novo PCR com *primers* AsdDT para verificação da eliminação do gene de resistência. Todo o procedimento está resumido na figura 1.

3.3.2. Construção dos Duplo-Mutantes $\Delta asd \Delta fis::cat$

Após a confirmação da eliminação do gene *cat* das linhagens Δasd , esta linhagem foi utilizada como receptora para as substituições gênicas $\Delta ihfA::cat$ e $\Delta fis::cat$, presentes nas linhagens doadoras 662ST $\Delta ihfA::cat$ e 662ST $\Delta fis::cat$, previamente construídas e armazenadas em nosso laboratório. Estas mutações foram transferidas por transdução generalizada mediadas pelo fago P22HT. Para tanto, as linhagens doadoras foram crescidas durante a noite em 3mL de LB acrescido de cloranfenicol. Na manhã seguinte, 50µL da suspensão celular foi reinoculada em 5mL do mesmo meio, pré aquecido a 37°C e crescidas

por 3 horas, 37°C, à 150rpm. Após as 3 horas as células foram centrifugadas 5000rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e elas foram ressuspensas em 5mL de LB acrescido com 500µL de suspensão de fago P22HT (10¹⁰ u.f.p.) e incubadas overnight à 37°C em aeração à 150rpm. Neste mesmo dia as linhagens receptoras Δasd foram inoculadas em 3mL de LB acrescido de DAP (50 µg/mL) e crescidas durante a noite. No terceiro dia da transdução, as células receptoras foram centrifugadas à 5000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22µm e armazenado. A linhagem receptora foi, por fim, misturada ao filtrado contendo fagos P22HT em diferentes proporções, e as misturas foram plaqueadas em LB acrescido de cloranfenicol e DAP. As transduções foram confirmadas por PCR utilizando-se *primers* DT específicos para cada gene.

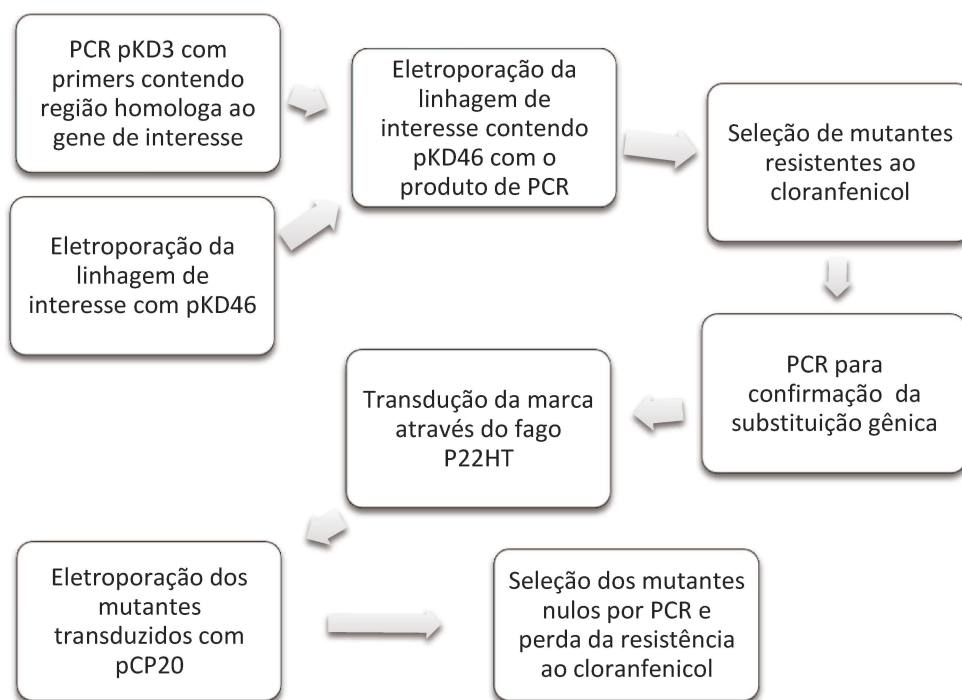


Figura 1: Representação esquemática do sistema λ-Red, proposto por Datsenko e Wanner (2000).

3.3.3. Construção dos plasmídeos e otimização de *m2*

As modificações moleculares foram feitas segundo protocolos contidos em Sambrook e Russel (2001). O plasmídio pYA3137, cedido pelo Prof. Roy Curtiss – Arizona State University – foi usado como base para a obtenção dos plasmídios pYASD, pYD3137 e seus derivados. pYASD foi criado a partir da amplificação do plasmídio pYA3137 com os *primers* pYA3137/*asd*, os quais possuem sítios de restrição para a enzima NotI inseridos em suas sequências. Após a amplificação o produto de PCR foi digerido com a enzima de restrição NotI (New England Biolabs) purificado em coluna e religado com a enzima T4 Ligase (New England Biolabs). O mesmo procedimento foi feito para a retirada do promotor *P_{trc}*, amplificando pYASD com os *primers* pYA3137/*trc*, entretanto neste segundo caso não foi inserido um novo sítio de restrição, mas sim o sítio EcoRI presente no início do sítio múltiplo de clonagem (o mapa do plasmídio pYA3137 original é representado na seção 5.6.2).

Para fazer a otimização da sequência do domínio *m2* para expressão em salmonela foi utilizada a ferramenta de otimização contida no domínio <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>. O algoritmo utilizado levou em consideração os códons presentes nos genes mais expressos de *Salmonella enterica* Typhimurium LT2, e usando o critério de otimização “Um aminoácido – Um códon”. A sequência otimizada foi alinhada no programa Clustall W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para comparação. A síntese da sequência otimizada foi feita por *Integrated DNA Technologies* (USA). A síntese da sequência otimizada foi feita fusionada ao sinal de secreção da betalactamase (Bla), que permite a secreção da proteína heteróloga para o espaço

periplasmático. Toda a sequência foi feita flanqueada pelos sítios de restrição NdeI na extremidade 5' e HindIII na extremidade 3' e clonado no vetor pIDTSMARToptm2.

3.4. Sequenciamento de DNA

Nas reações de sequenciamento foi utilizado o kit BigDye® Terminator Sequence Kit (Applied Biosystems), os primers universais M13 e o sequenciador automático ABI™ 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Os produtos de PCR obtidos à partir da amplificação de mutantes 662ST Δ *fis::cat* com primers FisDT foram clonados diretamente em pGEM-T® (Promega Corporation) utilizando as instruções do fabricante. O plasmídio foi usado para transformar células de *E. coli* eletrocompetentes, e após seleção por α -complementação e digestão dos plasmídios para confirmação do tamanho do inserto, estes foram extraídos sequenciados segundo protocolo estabelecido no LGE (Laboratório de Genômica e Expressão, Instituto de Biologia, UNICAMP). Para montagem dos *contigs* foi utilizado o programa ChromasPro™ versão 1.34 (Technelysium Pty Ltd).

As sequências foram preparadas, alinhadas e comparadas com sequências depositadas no banco de dados do GenBank e no banco de dados do LGE, para verificação da ocorrência de possíveis mutações.

3.5. Análise da expressão de *m2* em linhagens de *S. enterica* Typhimurium

A detecção da expressão do domínio M2 em *S. enterica* foi realizada por SDS-PAGE e *immunoblot*. Para as construções feitas com o promotor *PpagC* foi necessário induzir a expressão como descrito por Brandão (2002) antes da extração. Após 5 horas de cultivo as células foram centrifugadas e ressuspensas em LB acrescido de EDTA

200mM. A adição de EDTA induz a expressão dos genes regulados pelo sistema PhoP/PhoQ por diminuir ao máximo a concentração de Mg^{2+} no meio de cultura. Alternativamente, as células foram crescidas em meio MgM (Beuzón *et al.*, 1999) acrescido de $MgCl_2$ 20mM (condição repressiva). Após 5 horas de cultivo as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio MgM com $MgCl_2$ 8 μ M (condição indutiva). Para ambos os casos, a indução da expressão foi feita por 3 horas, 37°C, à 200 rpm.

Para a obtenção do extrato de proteínas totais foram feitas modificações nos protocolos descritos por Sambrook e Russell (2001). Devido ao caráter insolúvel da proteína, 5mL de suspensão celular crescidas por 6 horas foi centrifugados e ressuspensos em 125 μ L Tampão de extração 2X (Tris-HCl 200mM pH 8,0; DTT 4mM; PMSF 4mM; NaCl 600mM) gelado. Em seguida foi adicionado Lisozima (150 μ g/mL de extrato) e DNase (10 unidades). O volume foi completado para 250 μ L com Água Ultra-Pura (Gibco) e mantido em banho de gelo por 45 minutos. Após este tempo, as células foram lisadas por *shearing*, usando seringas hipodérmicas com agulhas ultrafinas, e fazendo fluxo até que a suspensão ficasse com aparência translúcida. O resultante foi centrifugado a 10000G por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi armazenado contendo a fração solúvel das proteínas totais. O precipitado foi ressuspensionado em 200 μ L de Tampão de Uréia (Tris HCl 10mM pH 8,8, NaH_2PO_4 100mM; Uréia 8M) e incubado durante a noite sob agitação leve, à temperatura ambiente.

As análises eletroforéticas foram feitas em gel de poliacrilamida a 12%, em condições desnaturantes, em sistema Mini Protean 3 Cell – Vertical Gel Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Hercules – CA, USA). A quantidade de 10 μ L de extrato protéico de cada amostra foi misturado a 10 μ L de Tampão de Laemmli (Laemmli, 1970).

Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie blue R250 (Bio-Rad, Richmond – CA, USA), conforme descrito em Sambrook e Russell (2001). Para inferir a massa molecular das bandas protéicas foram utilizados os marcadores de peso molecular para proteínas Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare) e SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (Bio-Rad).

A detecção de M2 foi realizada por *immunoblot*. As proteínas separadas por SDS-PAGE foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond™ C extra membrane, GE Healthcare) em mini-cuba (Mini Protean 3 Cell – Vertical Gel Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories, Hercules – CA, USA). As interações inespecíficas foram bloqueadas com Tampão PBS contendo Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St.Louis- MO, USA) a 0,1% e leite desnatado a 3% (PBS-Triton-Leite) por 40 minutos. A membrana contendo as proteínas foi reagida com soro de camundongo contendo anticorpo policlonal anti M2, obtido pelo Laboratório do Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa, diluído 1:1000 em solução de PBS-Triton-leite por 16 horas. Após algumas lavagens da membrana com a mesma solução, esta foi incubada com soro anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, St.Louis- MO, USA), na diluição 1:2000, por 1 hora. Em seguida a membrana foi lavada uma vez em PBS-Triton-leite, duas vezes em PBS acrescido de Triton 0,5% , e uma ultima vez em PBS acrescido de Triton 0,1%, sendo cada uma das lavagens com duração de 20 minutos sob agitação leve. Mais duas lavagens de 15 minutos, desta vez em Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,8 foram feitas. Por fim, a membrana foi banhada em 20 mL de tampão Tris-HCl 0,05M pH 6,8. Acrescentou-se 5mL de 4-cloro-1-Naftol 0,3%(P/V) diluído em metanol, seguido de 7mL de peróxido de hidrogênio à 30%.

4. RESULTADOS

4.1. Construção das linhagens mutantes

4.1.1. Mutantes Δasd

A construção de mutantes Δasd foi feita utilizando-se da técnica de λ -Red, estabelecida por Datsenko e Wanner (2000), para substituição e eliminação gênica, descrito em detalhes na seção 3.3. A Figura 2 mostra que, após a substituição gênica na linhagem *Salmonella enterica* Typhimurium 662ST, as células tornaram-se incapazes de crescer em meios de cultura não acrescidos de DAP. A Figura 3 demonstra, por sua vez, a partir do PCR utilizando-se dos *primers* AsdDT, substituição do gene *asd* pelo gene *cat* no genoma de 662ST. Ambas as imagens são dos resultados após a transdução, entretanto antes da transdução os resultados foram idênticos (dados não mostrados).

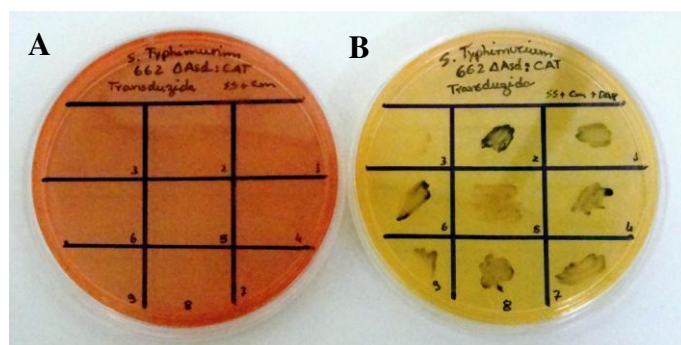


Figura 2: Mutantes *Salmonella enterica* Typhimurium 662 $\Delta asd:CAT$ plaqueados em Salmonella-Shigella Agar (SS) acrescido de Cloranfenicol 25 μ g/ml (A) e SS acrescido de Cloranfenicol 25 μ g/ml e DAP 50 μ g/ml (B).

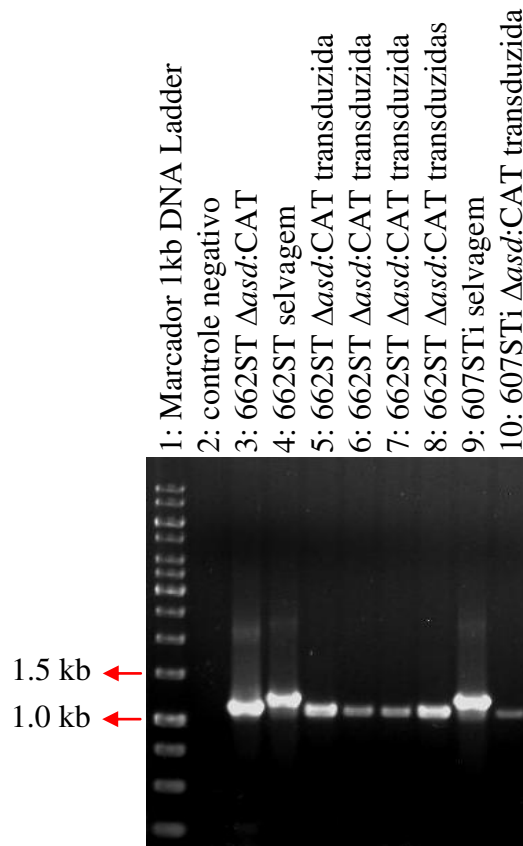


Figura 3: Amplificação com *primers* AsdDT em gel de agarose 1% mostrando a diferença de tamanho da mesma região genômica das linhagens selvagem e mutantes, indicando a substituição do gene *Asd* (1,3kb) pelo gene de resistência ao cloranfenicol (1,2kb).

Como mostrado por Datsenko e Wanner (2000) o plasmídio pCP20 expressa a recombinase FLP, capaz de unir sequências FRT (do inglês FLP Recognition Target), as quais flanqueiam o cassete de resistência ao cloranfenicol, promovendo a excisão deste cassete por recombinação. Assim sendo, após a confirmação da transdução do gene *cat* em substituição ao gene *asd* pelo PCR com os *primers* AsdDT, as células foram transformadas com o plasmídio pCP20 e crescidas conforme descrito anteriormente. O resultado do PCR usando os *primers* AsdDT mostram que a região genômica onde o gene *cat*

(aproximadamente 1,2Kb) foi inserido agora possui um tamanho bem menor (Figura 4), referente apenas a cicatriz deixada pela união dos sítios FRT.

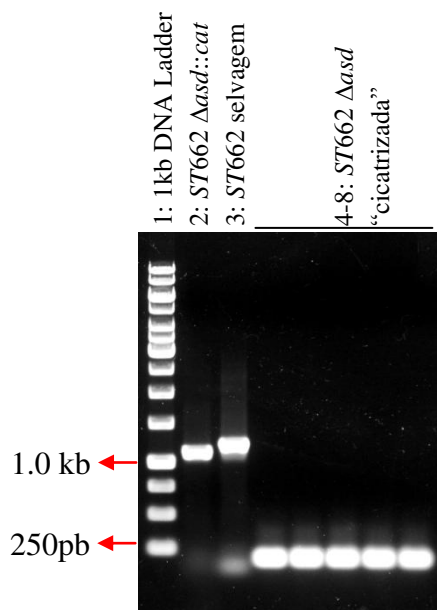


Figura 4: Retirada da marca de resistência ao cloranfenicol com o plasmídeos pCP20. Nas colunas 4-8 fica claro a deleção de toda a região genômica onde antes se localizava o gene *asd*.

4.1.2. Obtenção dos Duplo-Mutantes

Os duplo mutantes foram obtidos por transdução generalizada, à partir de mutantes 662Δ*fis*::*cat* e 662Δ*ihfA*::*cat* previamente construídos em nosso laboratório. Para confirmar a transdução da mutação foram feitas reações de PCR utilizando-se dos *primers* DT específicos para cada mutação, como mostrado nas Figuras 5 e 6. O resultado mostrado na Figura 5 foi obtido em colaboração com Damiani (2011), durante o desenvolvimento de sua tese de mestrado.

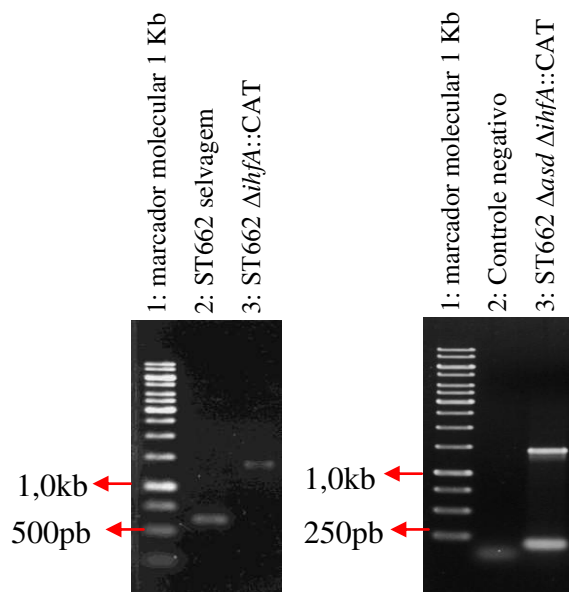


Figura 5: Construção do duplo mutante $\Delta asd\Delta ihfA::cat$. (A) Detecção da substituição de *ihfA* pelo cassete de resistência ao cloranfenicol. (B): Confirmação da criação de um mutante duplo para os genes *asd* e *ihfA* por multiplex PCR.

No resultado mostrado na Figura 6, como controles para os genes nativos foram usados os próprios mutantes simples. Assim sendo, o mutante $662\Delta fis::cat$ foi amplificado com os *primers* AsdDT, mostrando o padrão selvagem do gene *asd*, assim como o mutante $662\Delta asd$ foi amplificado com *primers* FisDT, mostrando o mesmo padrão esperado para linhagens selvagens. Estes resultados mostram evidências suficientes para afirmarmos que os mutantes e duplo mutantes foram construídos com sucesso.

No caso do mutante $662\Delta fis::cat$, foi ainda realizado o sequenciamento para mostrar a substituição total do gene *fis* pelo gene de resistência *cat*. Para tanto, o produto da amplificação dos *primers* FisDT foi clonado diretamente em pGEM-T[®] (Promega Corporation) e este foi sequenciado utilizando-se dos *primers* universais M13. As sequências obtidas foram validadas e um *contig* foi montado (Figura 7). No caso do mutante $\Delta ihfA$, o sequenciamento foi realizado em trabalhos anteriores.

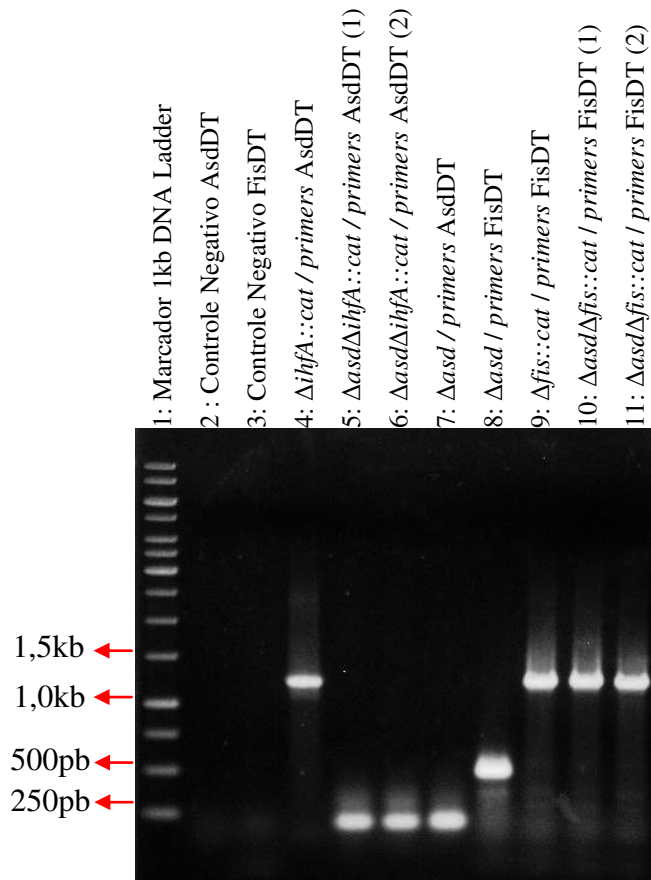


Figura 6: Construção do duplo-mutante $\Delta asd\Delta fis::cat$. Como podemos ver o mutante $\Delta ihfA::cat$ (4) mostra padrão selvagem para o gene *asd*, e padrão de “cicatriz” nos duplo-mutantes $\Delta asd\Delta ihfA::cat$ (5 e 6), idêntico ao mutante simples (7). O mutante Δasd , por sua vez mostra padrão selvagem para o gene *ihfA* (8), enquanto os duplo-mutantes $\Delta asd\Delta ihfA::cat$ (10 e 11) mostram o mesmo padrão do mutante simples $\Delta ihfA::cat$ (9).

Este *contig* foi alinhado com as seqüências depositadas no banco de seqüência genômicas do LGE/Unicamp (<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/salmonella/>), o qual contém seqüência genômicas das linhagens patogênicas 662ST e 607STi (Figura 8).

>Sequência Montada *Δfis::cat*

GCGTATAAAAAAGGCGCTTCCCCATGCCGAGTATCGCCTTTTTAAACAAGCAGTTAGCTAATCGAAATTAGTTC
ATGCCCATATGAATATCCTCCTTAGTTTCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTTCGGCGC
GCCTACCTGTGACGGAAGATCACTTCGCAGAATAAATAAATCCTGGTGTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCTGG
GCCAACTTTTGGCGAAAATGAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAACCTTTCACCATAATGAAATAAGATC
ACTACCGGGCGTATTTTTTGTGAGTTGTGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTG
GATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGT
ACCTATAACCAGACCGTTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAAGTTTTA
TCCGGCCTTTATTACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTACGTATGGCAATGAAAGACGGTG
AGCTGGTGATATGGGATAGTGTTTACCCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAAGTAAACGTTTTTCATCGCTC
TGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAA
CCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCA
GTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAA
GGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTTCAGGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTCCGCGAGAAT
GCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAAGGCGCGCCATTTAAATGAAGTTTCT
ATTCCGAAGTTTCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTTCGAAGCAGCTCCAGCCTACACTTCGAACATAGTTCT
GTCAGCTCTTTATTTCTGTTTACGCAAAATTTTCGAAGT

Figura 7: *Contig* montado a partir do sequenciamento do produto de amplificação gerado com *primers* FisDT. Sublinhado em azul, a região de homologia com *S. enterica* 662ST. Destacado em cinza, os sítios FRT. Apenas sublinhado a sequência codificante para a proteína Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT).

```
>NODE_8_length_36941_cov_60.011532
  Length = 36993
  Score = 146 bits (76), Expect = 3e-35
  Identities = 78/79 (98%)
  Strand = Plus / Minus
    Query: 1      gcgataaaaaagcgcttccccatgccgagtagtgcctttttaaacaagcagtttagcta 60
                  |||*|||
    Sbjct: 26704  gcgataaaaaagcgcttccccatgccgagtagtgcctttttaaacaagcagtttagcta 26645

    Query: 61      atcgaaattagttcatgcc 79
                  |||
    Sbjct: 26644  atcgaaattagttcatgcc 26626

  Score = 104 bits (54), Expect = 2e-22
  Identities = 54/54 (100%)
  Strand = Plus / Minus
    Query: 1096   ttcgaacatagttctgtcagctctttatttctgtttacgcaaaattttcgaagt 1149
                  |||
    Sbjct: 26349  ttcgaacatagttctgtcagctctttatttctgtttacgcaaaattttcgaagt 26296
```

Figura 8: Alinhamento mostrando regiões de homologia entre a sequência obtida pelo sequenciamento (Query, em azul na figura 7) e sequência de 662ST depositada no banco de dados do LGE/Unicamp.

Da mesma forma, o *contig* foi alinhado ao genoma de *S. enterica* Typhimurium LT2, depositada no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Figura 9). Este segundo alinhamento se fez necessário, pois neste banco de dados as seqüência genômicas já estão todas caracterizadas e o genoma montado, sendo assim possível identificar a posição exata no genoma onde a mutação ocorreu e o que existia ali anteriormente a substituição. Para o alinhamento foi utilizada o algoritmo BLAST, disponível nestes domínios.

```

ref|NC_003197.1| Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2
chromosome, complete genome
Length=4857432

Features in this part of subject sequence:
DNA-binding protein Fis

Score = 141 bits (76), Expect = 1e-31
Identities = 78/79 (99%), Gaps = 0/79 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GCGTATAAAAAAGGCGCTTCCCATGCCGAGTATCGCCTTTTAAACAAGCAGTTAGCTA 60
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 3556625 GCGTATAAAAAAGGCGCTTCCCATGCCGAGTAGCGCCTTTTAAACAAGCAGTTAGCTA 3556566

Query 61 ATCGAAATTAGTTCATGCC 79
      ||||||||||||||||
Sbjct 3556565 ATCGAAATTAGTTCATGCC 3556547

Features in this part of subject sequence:
tRNA-dihydrouridine synthase B
DNA-binding protein Fis

Score = 100 bits (54), Expect = 2e-19
Identities = 54/54 (100%), Gaps = 0/54 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1096 TTCGAACATAGTTCTGTCAGCTCTTTATTTCTGTTTACGCAAAATTTTCGAAGT 1149
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 3556270 TTCGAACATAGTTCTGTCAGCTCTTTATTTCTGTTTACGCAAAATTTTCGAAGT 3556217

```

Figura 9: Alinhamento mostrando posição exata onde ocorreu a substituição do gene *fis* pelo gene de resistência ao cloranfenicol, quando comparado ao genoma de *S. enterica* Typhimurim LT2.

Os resultados nos dão total segurança para afirmarmos que o local da substituição do gene *fis* por *cat* foi o local desejado. E com isso concluímos que os duplo-mutantes foram construídos com sucesso e estariam aptos a estabilização de plasmídios do sistema letal balanceado.

4.2. Construção dos vetores de expressão

Em estudos anteriores, Franzin (2009) concluiu a clonagem do domínio M2 de *Plasmodium yoelli* no vetor pYA3137trc, gerando por fim o vetor de expressão pYA3137trcm2. Com este vetor de expressão, foi possível verificar a expressão do domínio M2 na linhagem H683. Entretanto, os níveis de expressão não foram suficientes para gerar resposta imune protetora em camundongos. Com isso, nossos esforços se concentraram em melhorar os níveis de expressão deste domínio.

4.2.1. Otimização dos códons de *m2*

Por tratar-se de um antígeno de um organismo eucariótico, fizemos a otimização dos códons do domínio *m2* para a expressão em salmonela. O alinhamento entre a sequência nativa e a sequência otimizada é mostrado na Figura 11.

A análise realizada pelo próprio software utilizado para a otimização de códons chama a atenção para o número de modificações existentes entre as sequências nativa e otimizada. Num total de 1185 nucleotídeos, 841 não foram modificados, 216 foram substituídos por transição (purina-purina ou pirimidina-pirimidina) e 128 sofreram transversão (purina-pirimidina ou pirimidina-purina). Estas modificações ocorreram em 102 dos 395 códons da sequência. Em termos de porcentagem, 70,97% das bases não foram

modificadas, 18,23% sofreram transição e 10,80% sofreram transversão, refletindo modificações em 25,82% dos códons da sequência.

. Após a otimização, foi feita uma montagem *in silico* da sequência a ser sintetizada. Pensando no vetor de expressão que seria usado, a sequência foi ordenada, de 5' para 3', da seguinte forma: Sítio de restrição para NdeI; Sinal de secreção periplasmática da betalactamase (Bla); sequência *m2* otimizada (*optm2*); sítio de restrição para HindIII. O mapa do vetor contendo o gene sintetizado é mostrado na Figura 10A. Para confirmar foi feita uma dupla digestão com as enzimas NdeI e HindIII que gerou 2 fragmentos, o primeiro correspondente ao vetor de aproximadamente 2,1kb e o segundo correspondente ao segmento *bla-m2* de aproximadamente 1,3kb (Figura 10B). Um alinhamento comparando as duas sequências é mostrado na figura 11.

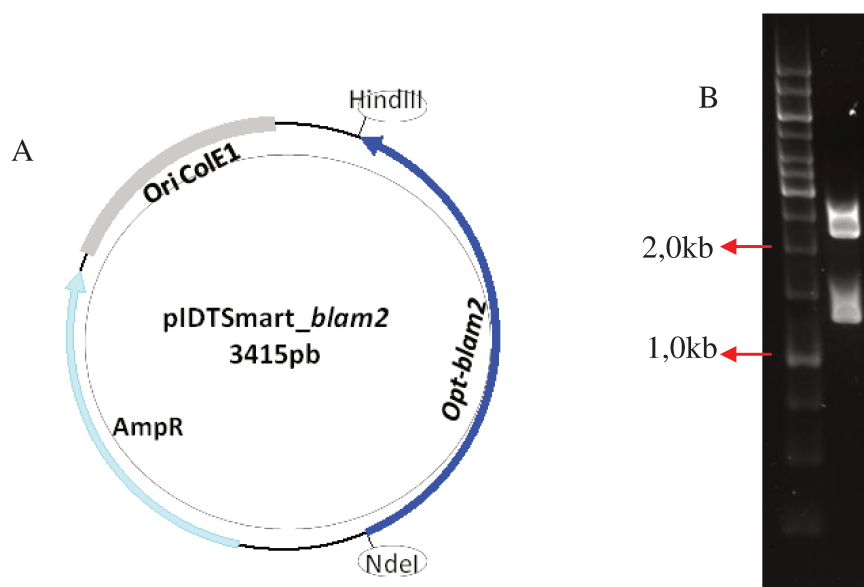


Figura 10: Síntese de *m2* otimizado. (A) Mapa do vetor de clonagem contendo a sequência otimizada de *m2* fusionada ao sinal de secreção da Betalactamase (Bla); (B) Digestão do plasmídeo com as enzimas NdeI e HindIII, mostrando a liberação do fragmento de 1,3kb.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

opt_m2	CTGAACAAATACATGAAATCCAACGTGGAACGTGCCGTACGAAAAATCCGGCCTGGCGATG	60
native_M2	CTTAACAAATATATGAAATCTAATGTTGAACTCCATATGAAAAAGTGGGTAGCTATG	60
	** *****	
opt_m2	CACCACGGCGACCTGTCCGTGTGCCGAAATCCTGGGACGAAGAAAACCTGTACAAAAA	120
native_M2	CATCATGGTGATTTAAGTGATGCCCCAAATCTGGGATGAAGAAAAATTTGTATAAAAA	120
	** ** * * *	
opt_m2	AACCGTGACTACAACACTACGACATGTGCAAATCCACCGTGATGAAATCCACCATCCCGCTG	180
native_M2	AATAGAGATTATAATTATGATATGTGCAAAAGCACTGAATGAAATCGACTATACCATTG	180
	** * * * * *	
opt_m2	AAAAATGTTGACTACAAAACCAAAAACTGCTGTACTTCGGCCTGTACGGCCTGGGCGGC	240
native_M2	AAAAATGTTTGATTATAAACTAAAAAAGTGTATATTTTGGTCTTTATGGTTTAGGGGGG	240

opt_m2	CGTCTGGGCTCCAACATCTCCAAAGTGAAAAACATCTTCAAATCCCAGCCGAACAACATC	300
native_M2	CGATTGGGATCTAATATTTCAAAGTAAAAAATATATTTAAATCACAGCCAAATAACATA	300
	** *****	
opt_m2	ACCCTGCCGATGTTCAACCCGTCTCCATCAAAAACCTGCTGGACTGCTCCCTGTACTCC	360
native_M2	ACATTACCAATGTTAATCCATCATCAATAAAAAATTTACTTGATTGTTGTTATATAGT	360
	** * * * * *	
opt_m2	TACTGCCTGGGCCCCTGCCTGGAAAACGCGTACAACAACAAATGCTTCCGTTCCCTGCCG	420
native_M2	TATTGTTTAGGTCCATGCCTGGAAAATGCATATAATAATAAATGTTCCGTTAGTCTGCCA	420
	** ** * * *	
opt_m2	GCGTACTTCAACCACGAACCAACGAATGCATCATCTGGGCACCCACGAACAGGAACGT	480
native_M2	GCATATTTTAATCATGAAACAATGAATGTATAATATTAGGAACACACGAACAAGAAAGG	480
	** * * * * *	
opt_m2	AACAACAACCTGCCGTACCCGTCTGTTCCGACACCGACAAACCGAACTGCCAGAACGTGCGT	540
native_M2	AATAATAATTGTAGAACGAGGAGATCTGATACAGATAAACCGAATTGCCAGAATGTTAGA	540
	** * * * * *	
opt_m2	AAAAACATCTCCACCAAAACCTGGACCTACGTGACCTCCTTCATCCGTCCGGACTACGAA	600
native_M2	AAAAATATATCAACAAAAAATTGGACATATGTAAATCATTATAGGCCAGACTATGAA	600

opt_m2	GAAAAATGCCCGCCGCTTACCCGCTGAAATTCAAATCCTTCGGCAAATACGACGAAGAA	660
native_M2	GAGAAATGCCCAAGATATCCTCTCAAATTTAAAAGTTTGGAAAATATGATGAAGAA	660
	** *****	
opt_m2	ACCGGCAAATGCAAATCCCTGATCAACAAAAAAACATCATCAACATCCCGCTGTTCTCC	720
native_M2	ACAGGAAATGCAAAAGTCTTATAAATAAAAAGAATATCATTAATATTCCTTTGTTTCT	720
	** * * * * *	
opt_m2	TCCTGCCTGGAATACATGTTTCATGTACCCGTCCGTGCTGCAGCGTACCGGAAAAAA	780
native_M2	TCTTGTTTGAATATATGTTTCATAATGTATCCTTCTGTTTACAGAGAACTGAAAAAA	780
	** ** * * *	
opt_m2	AACTACTGGGGCGTGTGGGTGGCGTCCGAATCCGTGAACTCCTCCAACCTGTACAACGCG	840
native_M2	AATTATTGGGGTGTGTGGGTGCAAGTGAATCTGTTAATTCGAGTAATTTGTATAATGCT	840
	** * * * * *	
opt_m2	AAAGGCGAATGCTACTACATCAACGAAAAACCGAACTGCGTGATCGACAAAGTGAACCAC	900
native_M2	AAAGGAGAATGTTATTATATAAATGAAAAACCTAATTGTGTTATTGACAAAGTAAATCAT	900

opt_m2	TTCTCCTTCACCTCCCTGACCACCAACGACATCGACTTCAACCAGAATCAACCTGGTG	960
native_M2	TTCTCATTTACTTCCCTCACAACAAATGATATTGATTTTAATCAAAATATTAATCTCGTA	960

opt_m2	AAACTGGACGAACTGGTGATCAACAACGACAGTCTCTCTCCACACCGTGCAGAAATAC	1020
native_M2	AAACTTGATGAATTAGTCATAAATAATGACCAATCATCTTCACATAATAGACCAAAATAT	1020

opt_m2	AACACCCCGATCGAAAACCTCCGAATCCACCATCGTGCGTAAACACAACCTCCGCGCCGAA	1080
native_M2	AATACGCCTATTGAAAATCTGAATCTACTATTGTAAGAAAAACATAATAGTGCTCTGAA	1080
	** * * * * *	
opt_m2	CACTTCCGTTCCTGAAAAATCAACTCTACACCCCGAACCGTCTGGCGAAAACTTCGCG	1140
native_M2	CATTTTCGTAGTTTAAAAATTACAGTTATACACCAATAGGAGGGGAGAAAATTTTGCA	1140
	** * * * *	
opt_m2	AAAGAATCCGACTCCACCCGTAAACCCGACGAATCCAAAATGTAA	1185
native_M2	AAGGAAAGTGATTCTACAAGAAATACCGATGAATCGAAAATGGAT	1185
	** ***	

Figura 11: Alinhamento das seqüências nativa e otimizada do domínio *m2* de MAEBL. Os asteriscos mostram os locais onde não houve troca de nucleotídeos.

4.2.2. Deleção dos promotores *Pasd* e *Ptrc*

As modificações plasmidiais foram feitas seguindo a idéia proposta por Kang e colaboradores (2002) com o objetivo de diminuir os níveis da proteína Asd. A expressão desta proteína em plasmídios de alta cópia compromete o crescimento e aumenta em até dez vezes a LD₅₀ da linhagem carreadora. A retirada do promotor, entretanto, faz com que os níveis desta proteína sejam próximo ao selvagem. A retirada dos promotores *Pasd* e *Ptrc* do vetor pYA3137 foram feitas utilizando a mesma estratégia para ambos, como descrito na seção 3.3.3. O mapa do plasmídio é mostrado na Figura 12, onde também são representados os locais de anelamento dos *primers* de retirada dos promotores.

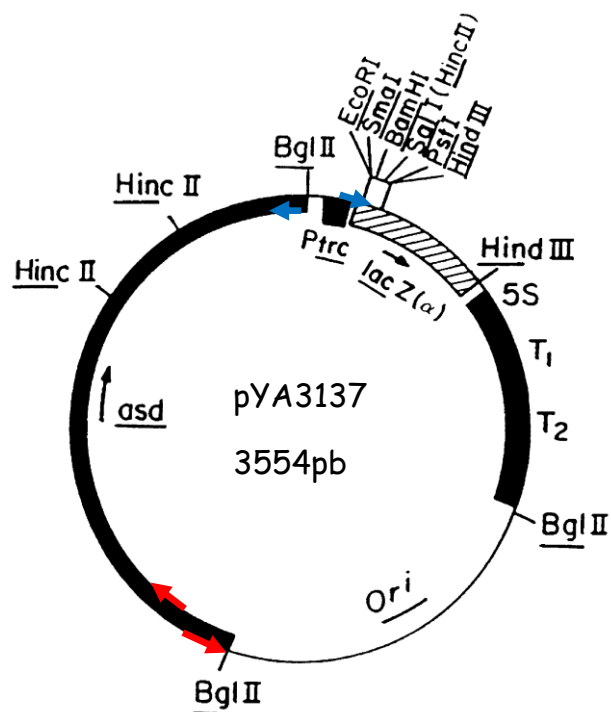


Figura 12: Mapa do plasmídio pYA3137. As setas em vermelho representam os *primers* pYA3137/*asd* e as setas em azul representam os *primers* pYA3137/*trc*. A origem de replicação deste plasmídio é a ColE1 do pUC18 (Adaptado de Galán *et al.*, 1990).

Em um primeiro momento, tentou-se utilizar o plasmídio pYA3137 $m2$ como molde, para obtermos de forma direta o vetor expressando a proteína M2 com baixos níveis de expressão de Asd, entretanto, por razões que serão discutidas mais adiante, não foi possível realizar esta construção. Portanto, as deleções foram todas feitas a partir do plasmídio pYA3137 original.

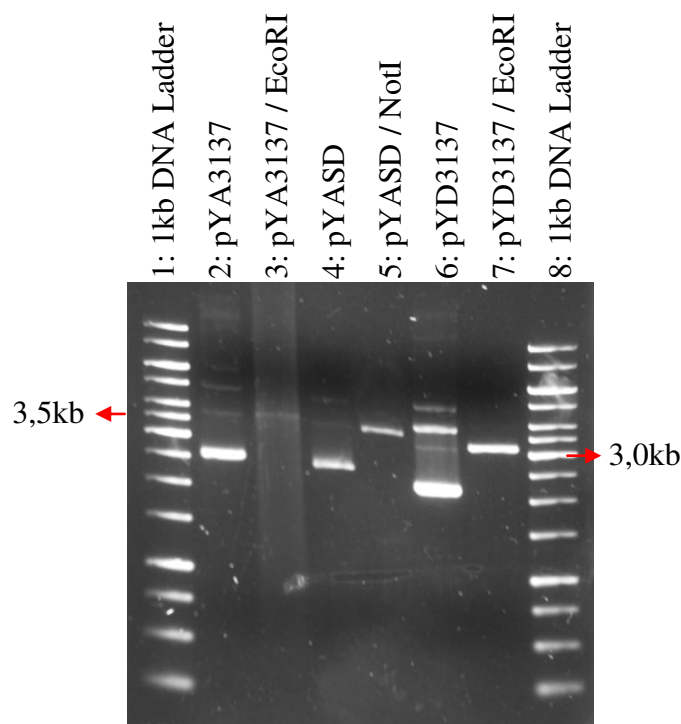


Figura 13: Construção dos plasmídios pYASD e pYD3137. A retirada do promotor *Pasd* gera uma deleção de 210pb, e a deleção do promotor *P_{trc}* gera uma deleção de 290pb.

Após a retirada do promotor *Pasd*, o plasmídio pYASD foi gerado (Figura 13), um plasmídio com exatos 210 pares de base a menos, comparado ao plasmídio pYA3137. Este plasmídio foi usado como molde para a retirada do promotor *P_{trc}*, para gerar o plasmídio pYD3137 (Figura 13), que por sua vez possui 290 pares de base a menos que o plasmídio

pYASD. Com isso, o vetor pYD3137 ficou pronto para ser utilizado como receptor direto para receber as construções a serem testadas.

4.2.3. Clonagem e montagem dos vetores de expressão

Algumas das construções inicialmente pretendidas para a expressão do domínio M2 não foram possíveis de serem realizadas. Após muitas tentativas frustradas de clonagem do gene *m2*, sob controle do promotor *P_{trc}*, nos vetores de clonagem pYASD e pYD3137, estas construções foram descartadas. É importante ressaltar que, apesar da impossibilidade inicial de se fazer as clonagens, para estas construções em particular, várias alternativas foram testadas com o objetivo de construí-las. Entretanto, após muitas estratégias testadas, e várias repetições, concluímos que não seria possível clonar o gene *m2* sob o controle do promotor *P_{trc}*, em vetores cujo promotor do gene *asd* havia sido deletado. Acreditamos que o motivo para a impossibilidade de se fazer essas clonagens esteja relacionado a um possível efeito tóxico desta proteína. Mais detalhes sobre este efeito serão discutidos mais adiante neste texto, mais especificamente nas seções 4.4 e 5.

O vetor pUC18***P_{pagC}* foi utilizado para a clonagem inicial do fragmento NdeI-*Blam2*-HindIII, obtido à partir da digestão de pSMART*blam2* com as enzimas de restrição NdeI e HindIII, e purificado em gel. Houve a necessidade da clonagem ser feita inicialmente neste vetor devido a presença de um sítio de restrição NdeI interno na sequência do plasmídeo pYD3137, impossibilitando a clonagem direta do promotor *P_{pagC}* e da posterior clonagem de *m2*. Este vetor inclusive foi utilizado com esta mesma finalidade em trabalhos passados (Brandão, 2002).

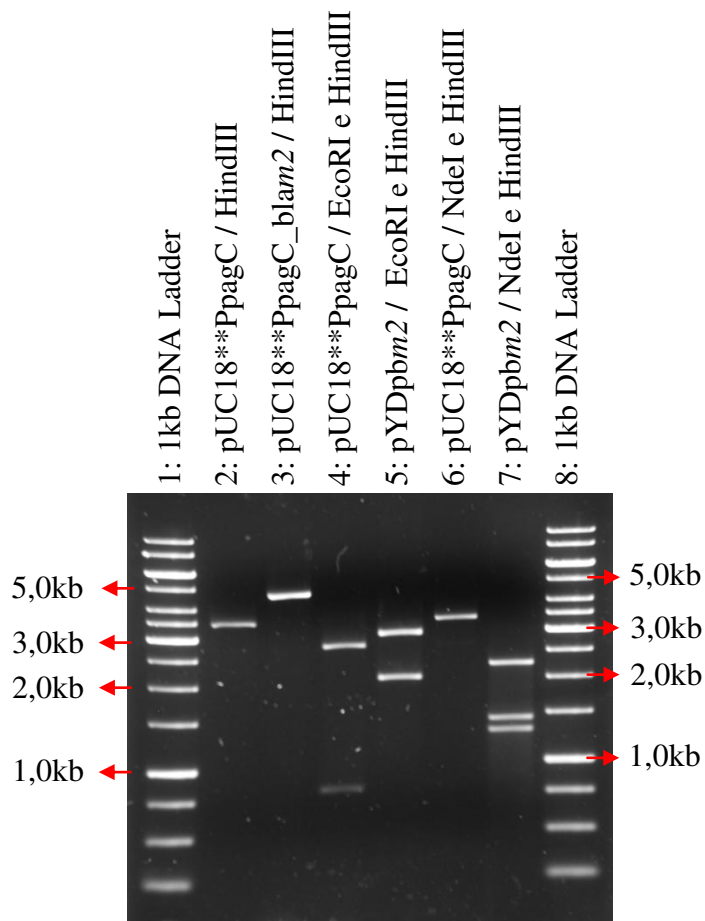


Figura 14: Construção do vetor de expressão pYDpbm2. A construção foi feita primeiramente em pUC18 modificado devido a presença de sítio interno para NdeI no vetor pYDpbm2.

O vetor foi digerido com as mesmas enzimas e foi feita a ligação, gerando o vetor pUC18**PpagCblam2. Este vetor foi utilizado para transformar células de DH10 β , utilizada para multiplicar e extrair o plasmídeo. O vetor foi extraído e digerido com as enzimas EcoRI e HindIII para liberar o fragmento PpagC-blam2, o qual foi clonado no vetor pYD3137, digerido com as mesmas enzimas, gerando o vetor de expressão pYDpbm2. Este plasmídeo foi inicialmente utilizado para transformar a linhagem χ 6212, para a confirmação da

construção. Todos os passos da clonagem foram controlados por digestão dos fragmentos gerados separados em gel de agarose e o resultado final destas clonagens estão mostrado na Figura 14. As figuras 15 e 16 resumizam todas as modificações e clonagens feitas para a montagem dos vetores de expressão.

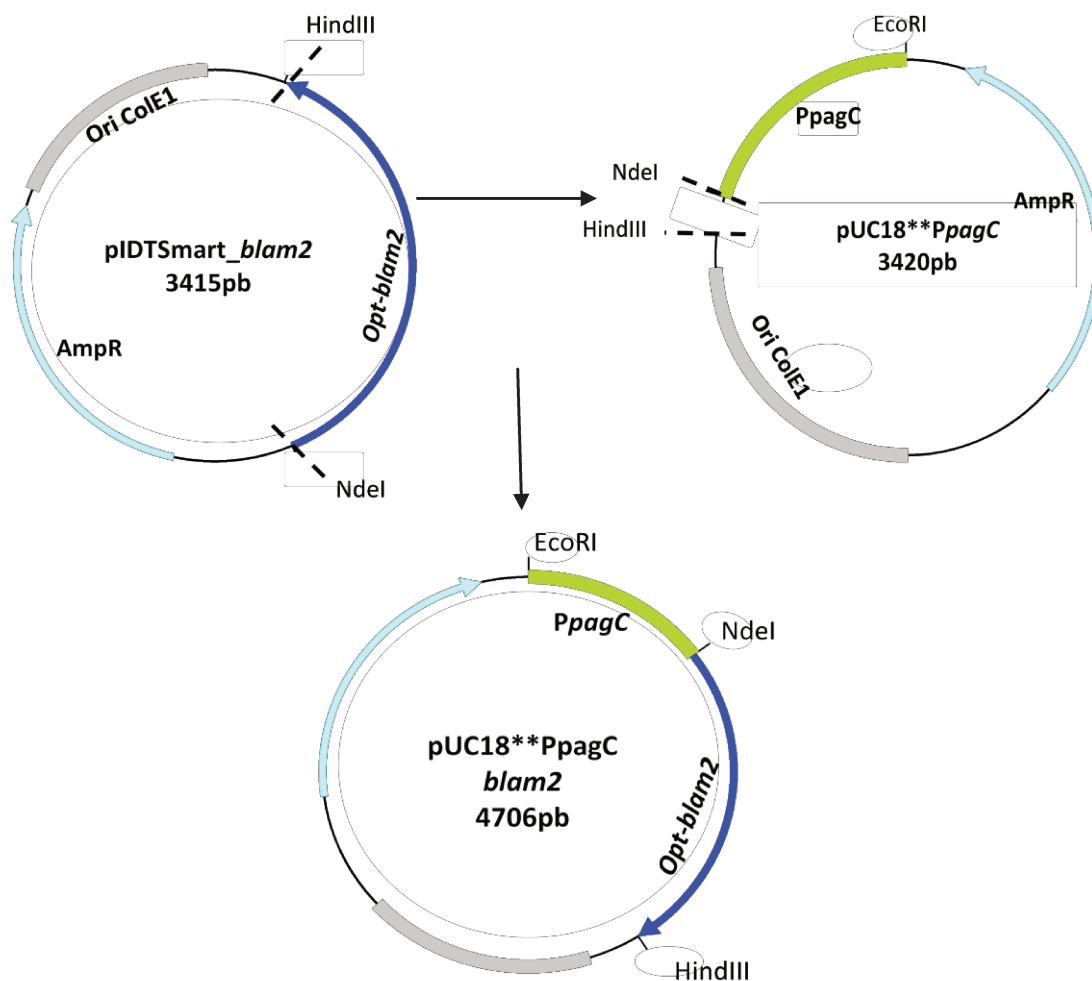


Figura 15: Representação esquemática demonstrando a montagem do vetor pUC18**PpagCblam2. O vetor contendo o gene sintético *blam2* foi digerido com as enzimas NdeI e HindIII e gene foi clonado no vetor pUC18**PpagC. Esta etapa foi necessária devido a presença de um sítio interno para NdeI no vetor pYD3137.

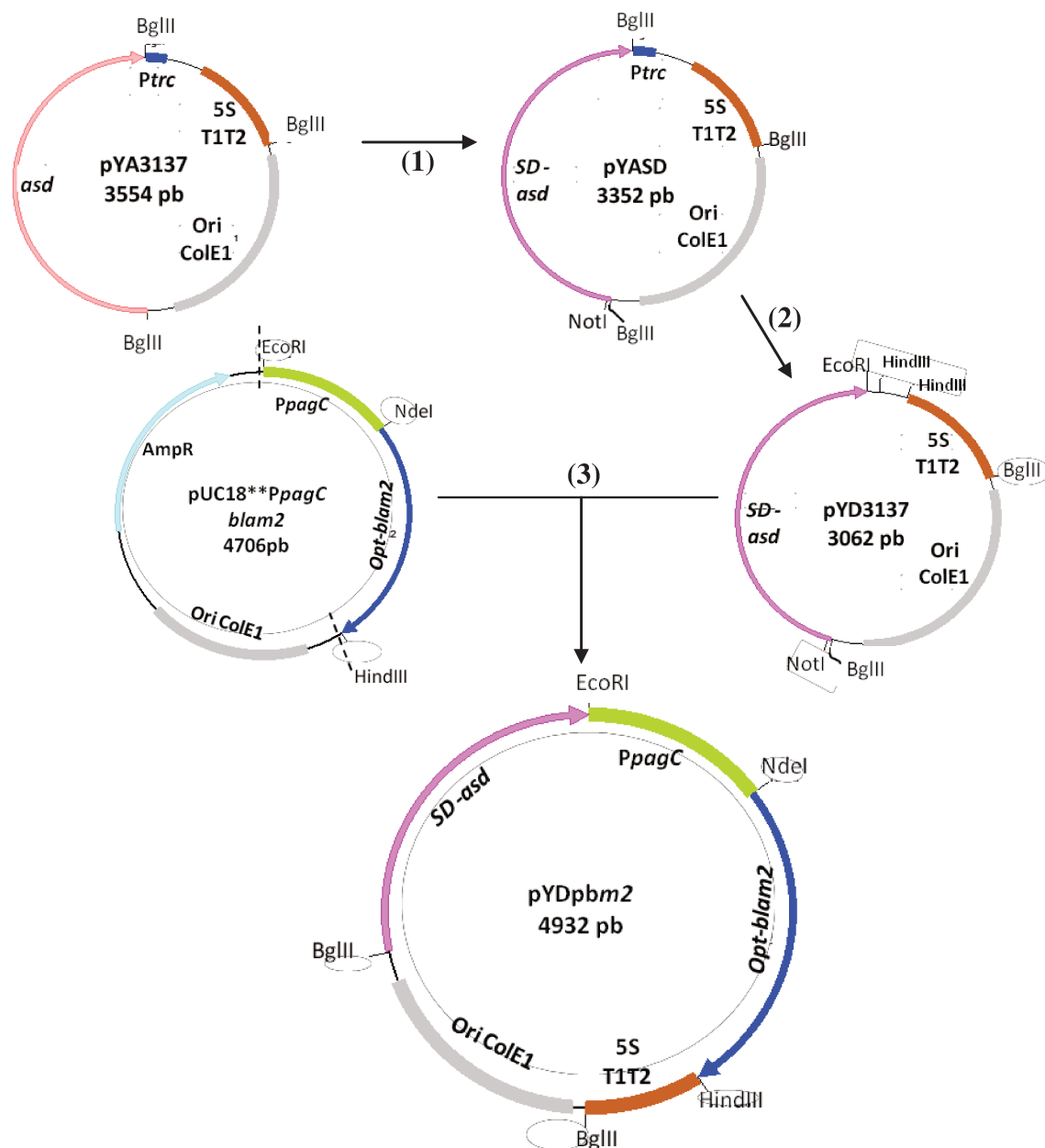


Figura 16: Representação esquemática demonstrando a montagem do vetor pYDpbm2. No primeiro passo ocorre a retirada do promotor do gene *asd* gerando o vetor pYASD. No segundo passo o promotor *Ptrc* é retirado gerando pYD3137. A última etapa ocorre com a clonagem do cassete *PpagC-blam2*, retirado do vetor pUC18**PpagCblam2, no vetor pYD3137, ambos digeridos com EcoRI e HindIII.

4.2.4. Transformação dos duplo-mutantes com os plasmídios de expressão

Após as construções terem sido feitas e confirmadas com sucesso os plasmídios de expressão foram inseridos por eletroporação nas linhagens duplo-mutante $662\Delta asd \Delta fis::cat$ e $662\Delta asd\Delta ihfA::cat$. A confirmação da transformação foi feita por digestão dos plasmídios extraídos das linhagens transformadas (Figura 17).

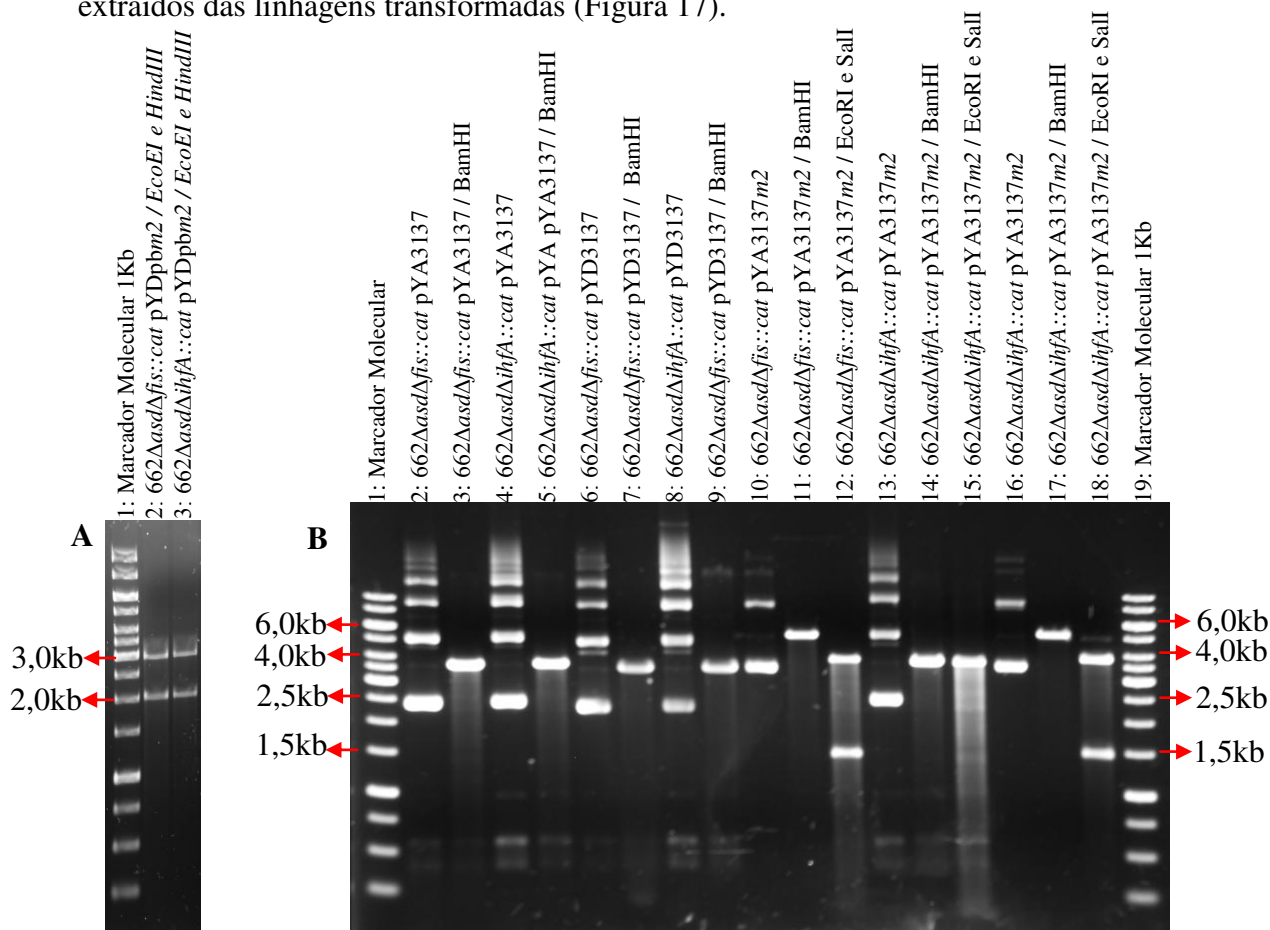


Figura 17: Confirmação da transformação dos mutantes $662\Delta asd\Delta fis::cat$ e $662\Delta asd\Delta ihfA::cat$. (A) liberação do fragmento *PpagC-blam2* de aproximadamente 2kb após digestão dos plasmídios extraídos com EcoRI e HindIII. (B) Extração, linearização e liberação dos cassetes de expressão *Ptrcm2*, evidenciados em 12 e 18, confirmando a transformação com sucesso das linhagens $662\Delta asd\Delta fis::cat$ e $662\Delta asd\Delta ihfA::cat$.

4.3. Curvas de crescimento

Durante a construção dos mutantes notamos a impossibilidade na clonagem do gene *m2* com códon otimizado em vetores cuja expressão fosse regulada por promotores constitutivos. Isso nos indicou que este gene poderia estar induzindo efeitos tóxicos para as células. Para analisar este possível efeito, foram feitas curvas de crescimento com as linhagens previamente testadas quanto a capacidade de expressar antígenos heterólogos pelo sistema letal balanceado (Galán *et al.*, 1990). A linhagem H683 foi transformada com os plasmídios pYA3137 e pYA3137*m2*. Na figura 18 fica evidente que o crescimento microbiano é prejudicado pela expressão de *m2*.

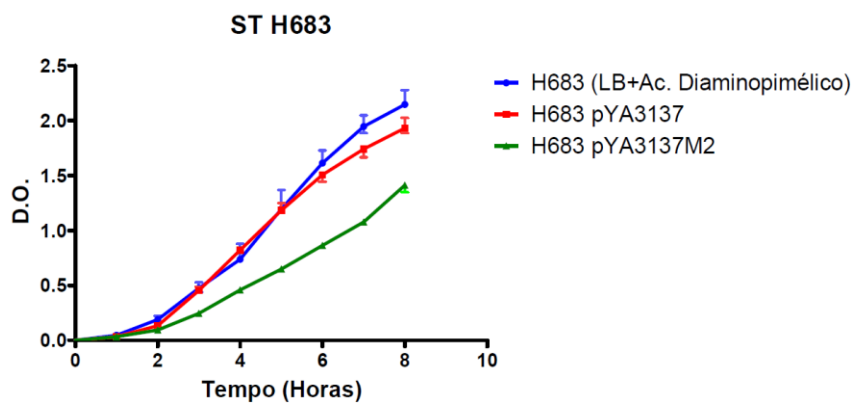


Figura 18: Curva de crescimento das linhagens H683 sem plasmídios, H683 pYA3137 e H683 pYA3137*m2*.

As curvas de crescimento para as linhagens 662 Δ *asd* Δ *fis*::*cat* e 662 Δ *asd* Δ *ihfA*::*cat* foram mais difíceis de se obter. De fato, apenas para a linhagem 662 Δ *asd* Δ *ihfA*::*cat* foi possível obter reprodutibilidade suficiente (Figura 19). Muito provavelmente isso se deva a necessidade de uma melhor padronização dos pré-inóculos que serão discutidos

posteriormente. Para os mutantes *ihfA* é bem perceptível a presença de uma fase *lag* mais longa, esta diferença fica mais evidente quando comparamos por exemplo as duas linhagens contendo o mesmo plasmídeo (Figura 120) mas não foi possível notar o mesmo padrão de crescimento menor em função da presença do gene *m2* evidenciado em H683.

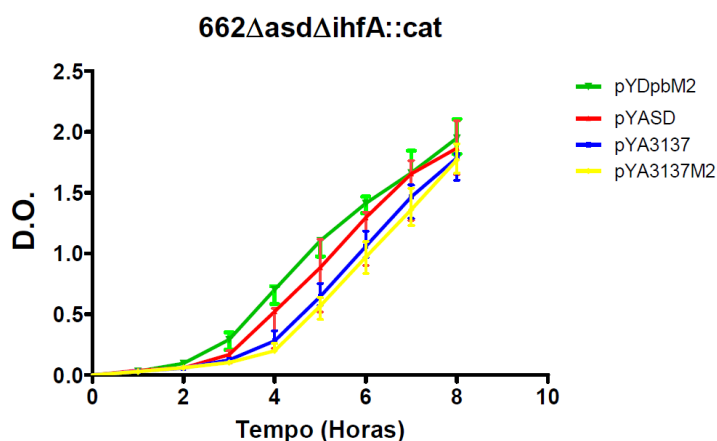


Figura 19: Curva de crescimento das linhagens 662ΔasdΔihfA::cat contendo os plasmídios pYASD, pYA3137, pYA3137m2, pYDpbm2

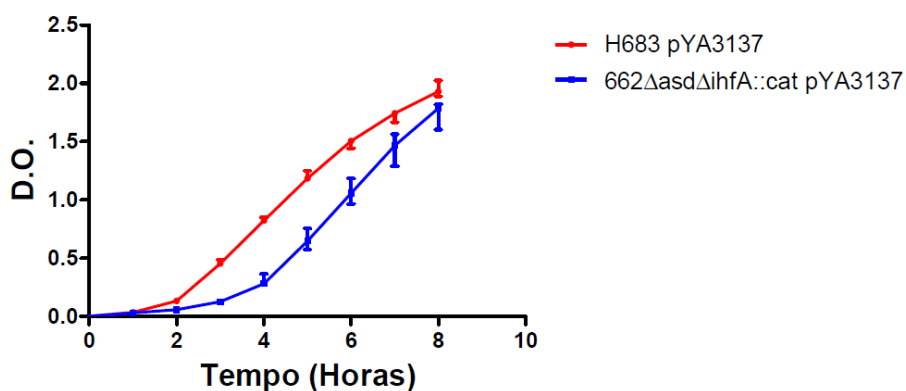


Figura 20: Curva de crescimento das linhagens H683 pYA3137 comparada a linhagem 662ΔasdΔihfA::cat pYA3137, evidenciando uma fase *lag* muito maior da segunda.

4.4. Análise das proteínas totais das linhagens mutantes transformadas

Para a verificação da expressão do domínio protéico M2 nas linhagens de *S. enterica* Typhimurium 662 Δ *asd* Δ *fis*::*cat* e 662 Δ *asd* Δ *ihfA*::*cat*, após a transformação destas linhagens com os plasmídios de expressão, foi feita por SDS-PAGE.

Conforme descrito na seção 2.5 deste texto, foi realizada a extração e análise das proteínas totais dos mutantes transformados, para analisar a expressão de *m2*. A extração foi feita de forma a fracionar o extrato proteico bruto em fração solúvel e insolúvel. Em nenhuma das duas frações foi possível visualizar a expressão do domínio M2 o que provavelmente está relacionado à presença de outras bandas proteicas de peso molecular muito próximo ao domínio M2, que deveria aparecer na altura correspondente a 45kDa (Figura 21). Por tratar-se de uma proteína insolúvel (Ghai *et al.*, 2002), esta é de difícil visualização.

A análise da fração solúvel, onde é possível visualizar a expressão da proteína Asd de 39kDa, possibilitou constatar que a estratégia para retirada da região promotora do gene *asd* teve resultado semelhante ao descrito por Kang *et al.* (2002). Entretanto, fica muito claro, que a clonagem de *m2* no plasmídio pYA3137 leva a uma redução muito grande no nível de expressão da proteína Asd. Esta redução pode estar sendo causada por uma eventual toxicidade da proteína M2 que impede o crescimento normal desta linhagem, ou também pode estar levando a uma redução no número de cópias do vetor de expressão (Figura 21, A1 e B1).

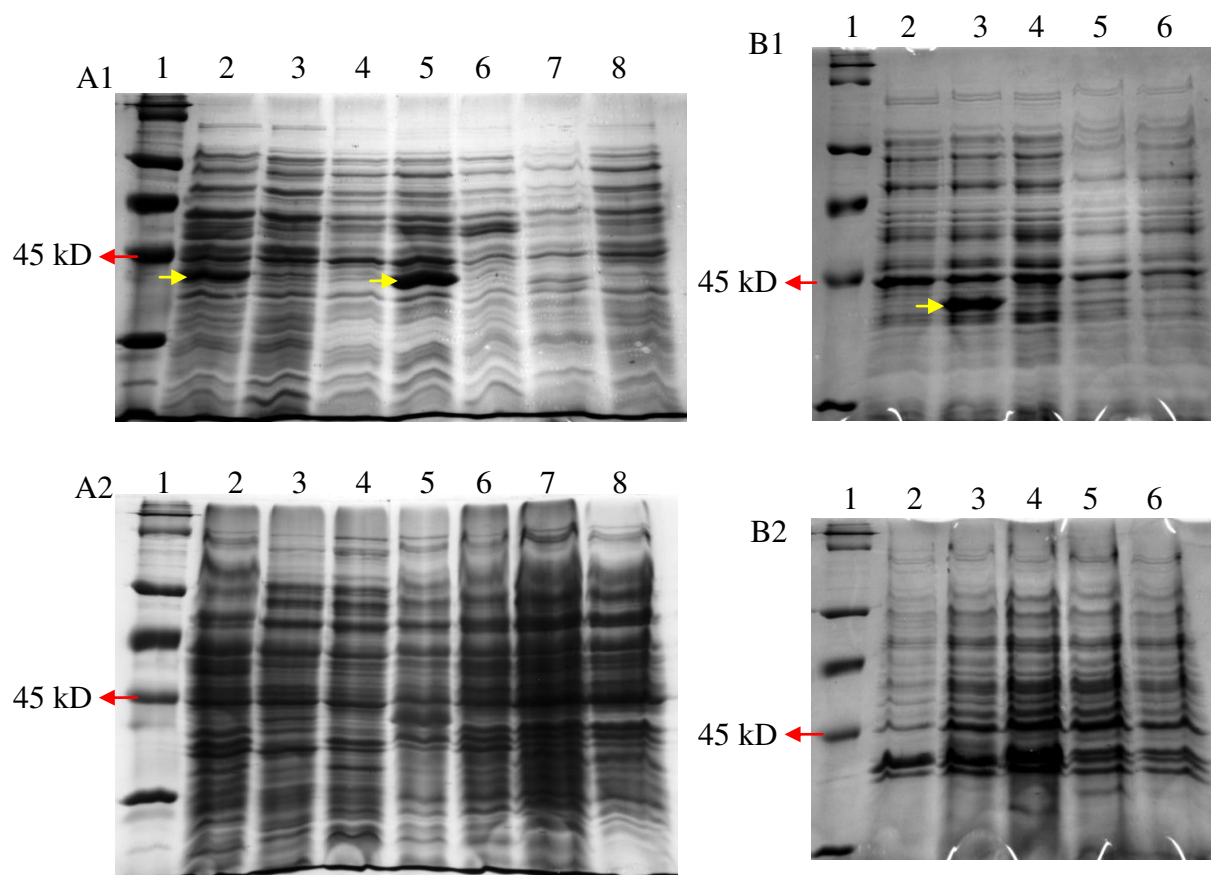


Figura 21: SDS-PAGE dos extratos protéicos das linhagens atenuadas de *S. enterica* transformadas A1 e B1, frações solúveis; A2 e B2 frações insolúveis. (A1 e A2) 1: Marcador Molecular Weight Standards, Broad Range; 2: H683 pYA3137trc; 3: H683 pYA3137trcm2; 4: 662 Δ asd Δ ihfA::cat pYASD; 5: 662 Δ asd Δ ihfA::cat pYA3137trc 6: 662 Δ asd Δ ihfA::cat pYA3137trcm2; 7: 662 Δ asd Δ ihfA::cat pYDpbm2 crescido em meio acrescido de Mg²⁺; 8: 662 Δ asd Δ ihfA::cat pYDpbm2 crescido em meio acrescido de EDTA. (B1 e B2) Extratos protéicos da linhagem 662 Δ asd Δ fis::cat, transformadas com os plasmídios 1: Marcador de peso Molecular; 2: pYA3137m2; 3: pYA3137; 4: pYASD; 5: pYDpbm2 crescido em meio acrescido de Mg²⁺; 6: pYDpbm2 crescido em meio acrescido de EDTA.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de identificar e descrever possíveis alvos para o desenvolvimento de uma vacina contra malária (Collins & Barnwell, 2008). O antígeno MAEBL, identificado como uma proteína de membrana de 200KDa, expressa no parasita nos estágios de esporozoíto e merozoíto, se destaca como uma molécula promissora para compor uma vacina de subunidade (Ghai *et al.*, 2002).

Um fator importante na construção de uma vacina de subunidade é o modo como este antígeno será apresentado para o sistema imune, de modo que estimule uma resposta protetora. Neste sentido, o uso de linhagens atenuadas de *Salmonella enterica* tem se mostrado uma proposta atrativa que ganha contornos ainda mais importantes quando consideramos que a resposta imune contra a malária leva a uma maior suscetibilidade a salmonelose (Cunnington *et al.*, 2012). Desta forma, o desenvolvimento de uma linhagem recombinante que consiga imunizar contra essas duas infecções é uma alternativa que desperta muito interesse.

A utilização de *S. enterica* Typhimurium como carreadora de antígenos heterólogos tem sido bastante explorada e tem demonstrado que linhagens atenuadas dessa espécie podem ser obtidas e utilizadas com sucesso como carreadoras de antígenos vacinais para células do sistema imune, estimulando assim vários mecanismos efetores, envolvidos na proteção contra patógenos intracelulares (Curtiss III *et al.*, 2010; Cheminay e Hensel, 2008).

O uso de linhagens vivas atenuadas de *S. enterica* em formulações vacinais apresenta inúmeras vantagens sobre vacinas convencionais (Atkins *et al.*, 2006). Dentre as quais podemos citar a dispensa da purificação do antígeno, a passagem do antígeno através da

barreira estomacal sem degradação ou desnaturação, não indução de tolerância e a dispensa do uso de adjuvantes. Além disso, tais linhagens são plenamente capazes de estimular diferentes respostas do sistema imune, possuem tropismo por células do sistema imune como células dendríticas e macrófagos, onde podem sobreviver por longos períodos atuando como fonte constante de antígenos, que estimula de maneira eficiente o sistema imunológico do hospedeiro, ao entregar o antígeno diretamente nos sítios indutivos da resposta imune (Karem *et al.*, 1995).

Além disso, por tratar-se de uma bactéria do trato gastro-intestinal, uma vacina baseada em *S. enterica* pode ser administrada por via oral, a rota natural de infecção deste microorganismo (Atkins *et al.*, 2006). Isso confere muitas vantagens sobre as vacinas injetáveis, como a simplicidade e o custo na administração, dispensando a esterilização do local e de materiais para sua aplicação (Nalin, 2002).

Em trabalho anterior do nosso grupo tentou-se desenvolver uma vacina que conferisse proteção contra a malária no modelo experimental murino, utilizando-se uma linhagem de *S. enterica* Typhimurium atenuada, expressando o domínio M2 do antígeno MAEBL de *Plasmodium yoelii*. Os dados obtidos, entretanto, indicaram a necessidade de novos experimentos, através de modificações no sistema de expressão, pelo uso de um sistema exportador, ou através de utilização de diferentes regimes de imunização, para tentar obter uma resposta imune mais efetiva contra a malária. (Franzin, 2009).

A eficácia de vacinas vivas, baseadas em *S. enterica* Typhimurium recombinante, na indução da resposta imune contra o antígeno heterólogo é determinada por múltiplos fatores, incluindo o genótipo do hospedeiro (Fayolle *et al.*, 1994), o genótipo bacteriano (Covone *et al.*, 1998), o tipo de mutação atenuadora da virulência e o sistema de expressão utilizado

(Bjorkman *et al.*, 1994). Este deve, preferencialmente, expressar o antígeno heterólogo de forma estável no hospedeiro e em grandes quantidades (Medina *et al.*, 2000).

As linhagens atenuadas de *Salmonella* escolhidas para este estudo foram obtidas a partir da linhagem selvagem 662ST, tendo esta linhagem sido repicada em meios de cultura o mínimo de vezes possível, na tentativa de manter o máximo possível de suas características selvagens. Os mutantes de *Salmonella enterica* Typhimurium $\Delta ihfA$ e Δfis são atenuados quanto virulência no modelo murino (dados não publicados), e por serem mutantes obtidos muito recentemente por nosso grupo, ainda não sabíamos como eles se comportariam ao serem utilizados como produtores de antígenos heterólogos.

Para testar estes mutantes quanto a sua capacidade de expressar antígenos heterólogos, foi necessário introduzir a mutação Δasd nestas linhagens. Esta mutação, demonstrada pela primeira vez por Galán e colaboradores (1990), permite a obtenção do sistema letal balanceado *asd*. Esse sistema confere a capacidade de estabilização de plasmídios sem que haja a necessidade de utilização de marcas de resistência a antibióticos e favorece uma alta e estável expressão de proteínas heterólogas em *S. enterica* e, conseqüentemente, pode levar a uma resposta imune consistente.

A obtenção do mutante Δasd via sistema de recombinação λ -Red procedeu-se como descrito por Dantsenko e Wanner (2000), exceto pela particularidade da mutação auxotrófica gerar a necessidade de adicionar-se DAP ao meio de cultivo para o crescimento do mutante. Com o mutante confirmado, foi feita a transdução das mutações atenuantes via fago P22HT, gerando os mutantes atenuados *S. enterica* Typhimurium 662 $\Delta asd\Delta fis::cat$ e *S. enterica* Typhimurium 662 $\Delta asd\Delta ihfA::cat$.

Com os mutantes prontos, seguimos para as modificações nas construções plasmidiais. Um dos problemas da utilização do plasmídio pYA3137 como vetor de expressão são os altos níveis de produção da proteína Asd. Por tratar-se de um plasmídio com alto número de cópias, a proteína Asd acaba sendo expressa em níveis muito superiores ao desejável, prejudicando o *fitness* celular. Como proposto por Kang e colaboradores (2002), foi possível baixar os níveis de expressão desta proteína para níveis próximos ao nativo deletando-se a região promotora deste gene no plasmídio pYA3137, criando-se assim o plasmídio pYASD.

Logo em seguida a construção de pYASD, tentamos a retirada do promotor *Pasd* do plasmídio pYA3137trcm2, previamente construído por Franzin (2009), utilizando-se da mesma estratégia, entretanto não foi possível, se quer, amplificar o plasmídio por PCR. Não buscamos detectar qual seria o problema neste caso, pois nosso alvo principal não era fazer a expressão do segmento *m2* nativo, tampouco usar o promotor constitutivo *Ptrc*.

O uso de sistemas de expressão com alto número de cópias nos quais a expressão de antígenos é controlada por promotores constitutivos, como é o caso do pYA3137, incidem uma sobrecarga metabólica para a linhagem vacinal, que podem levar a vários efeitos indesejados como hiperatenuação, falta de viabilidade, perda do plasmídio e outros que resultam em baixa imunogenicidade (Wang, 2010).

Brandão (2002) em seus estudos comparando diferentes promotores concluiu que altos níveis de expressão podem ser obtidos utilizando-se o promotor induzível *in vivo* *PpagC*. Este promotor tem sua expressão regulada pelo sistema PhoP/Q e só é ativado *in vivo*, ou quando o meio de cultura é manipulado deixando as concentrações de Mg^{2+} no mínimo (Kong et al., 2008). Isso nos direcionou na escolha do promotor a ser utilizado para

controlar a expressão de *m2*, e procedemos com a retirada do promotor *P_{trc}* do vetor pYASD, para obtermos o vetor pYD3137.

Por tratar-se de um gene proveniente de um parasita eucariótico, resolvemos verificar se a grande disparidade na composição de *códons* de *Plasmodium* em relação à *Salmonella* presente na sequência de *m2* estaria prejudicando a expressão deste domínio. Alguns trabalhos relatam que a otimização de *códons* pode ser bastante relevante em sistemas de expressão heteróloga, chegando a aumentar em 4 vezes a expressão de proteínas de *Plasmodium* expressas em *E. coli* (Yadava and Ockenhouse, 2003), ou até mesmo possibilitando a expressão de genes impossíveis de serem expressos em sua forma nativa (Mehlin, 2006).

Outra estratégia que pode levar a um aumento na resposta imune contra antígenos heterólogos é a secreção destes para o meio extracelular ou sua apresentação na superfície celular. Além disso, a secreção de antígenos heterólogos pode diminuir a toxicidade para a bactéria, facilitando seu crescimento e aumentando o sucesso na apresentação destes antígenos ao sistema imune (Xin, 2008).

Desta forma, após as análises da composição dos *códons* de *m2* ter mostrado a presença de alguns *códons* bastante incomuns, foi feita a síntese de um gene *m2* sintético, e aproveitamos para incluir o sítio de secreção da beta-lactamase (*bla*) na porção 5' da sequência, evitando, assim futuras manipulações da sequência.

Assim sendo, procedemos para a montagem do sistema de expressão heteróloga. Neste sistema, a expressão do antígeno heterólogo é regulado pelo promotor induzível *in vivo* *P_{pagC}*. O gene expresso possui o sinal de secreção da betalactamase utilizado em outros modelos de expressão heteróloga em *Salmonella* (Kang, 2002), e sua sequência de

códons foi otimizada, substituindo os códons originais por códons mais comumente expressos em *Salmonella*. Tudo isso gerou o vetor de expressão pYDpbm2.

A clonagem do gene *m2* otimizado expresso sob regulação do promotor *P_{trc}* não foi possível de ser realizada no plasmídio pYD3137. As análises dos extratos protéicos solúveis das linhagens expressando M2 nativo demonstram uma redução muito acentuada nos níveis de expressão de Asd, o que pode indicar uma redução no número de cópias deste plasmídio. Como demonstrado por Kang e colaboradores (2002), a deleção da região promotora do gene *asd* em plasmídios com baixo número de cópias não produz Asd em níveis suficientes para manter o sistema letal balanceado.

Franzin (2009) analisou a diferença no crescimento de duas linhagens de *Salmonella*, uma delas expressando o domínio M2 e a outra não, e não verificou diferença no crescimento de ambas, o que a levou a concluir que a expressão deste domínio não estivesse sendo tóxica para as células. Neste estudo, Franzin avaliou o número de unidades formadoras de colônias (CFU) da cultura. No presente estudo, avaliamos tanto o número de células (dados não apresentados) quanto à densidade ótica (DO) das culturas. De fato, os dados de CFU confirmaram os resultados de Franzin. No entanto, observamos que a DO das culturas variaram entre H683 produtora e não produtora de M2. Estes resultados podem ser explicados pela formação de agregados celulares e/ou alterações no tamanho das células bacterianas, levando a uma alteração da DO a despeito do número de células. Desta forma, nossos dados indicam um possível efeito tóxico de M2, observação esta que não havia sido detectada anteriormente pelas curvas de crescimento baseadas em CFU. Assim, novos estudos são necessários para melhor esclarecer o efeito tóxico de M2.

Com isso, duas teorias não exclusivas surgiram. A primeira delas é de que a otimização de códons tenha resultado num aumento muito acentuado da expressão do domínio M2, e este esteja sendo tóxico para as células quando em altas concentrações. A segunda é que a clonagem do gene *m2* implica na diminuição drástica do número de cópias do plasmídio, o que levaria a produção insuficiente da proteína *m2*. Desta forma, além da detecção da expressão de M2 por *immunoblot*, ainda deverão ser feitas novas curvas de crescimento das novas linhagens expressando *m2*, além de verificar se de fato está havendo diminuição do número de cópias dos plasmídios. *Primers* já foram sintetizados para a análise da expressão de M2 por PCR quantitativo, o que deve mostrar com maiores detalhes a expressão deste domínio.

As dificuldades na avaliação da expressão de M2 por SDS-PAGE corroboram dados anteriores obtidos pelo nosso grupo. De fato, M2 é bastante insolúvel o que dificulta a solubilização e visualização por SDS-PAGE. De qualquer forma, existem observações indiretas que esta proteína esteja sendo expressa. Uma delas é a diminuição na expressão de Asd o que sugere diminuição no número de cópias do plasmídio devido a expressão de M2 e a imposição de condições fisiológicas mais restritivas para a célula. De qualquer forma, como explicitado acima, novos estudos são necessários para esclarecer estas dúvidas. Além disso, no futuro deverá ser avaliada a transcrição de *m2* por *imunoblott* e PCR quantitativo. Para os ensaios de *imunoblott* estamos aguardando a obtenção de *m2* purificado por parte de nosso colaborador, Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa e para PCR quantitativo já foram sintetizados *Primers* para a análise de expressão. Esses dados deverão mostrar com maiores detalhes e confirmar, ou não, a expressão deste domínio.

Para direcionar ainda mais a resposta imune para M2, as alternativas à expressão do antígeno heterólogo no vetor vivo podem ainda serem combinadas com um refinamento na estratégia de vacinação, por exemplo, aumentando as doses da formulação vacinal a ser obtida. Mais interessante ainda seria incluir um sistema de vacinação do tipo “*prime-boost*” heterólogo, envolvendo a administração sequencial do mesmo antígeno em duas formulações vacinais diferentes, utilizando ou não a mesma rota de administração.

Essa estratégia de vacinação demonstrou aumentar a imunogenicidade de antígenos heterólogos expressos por vetores bacterianos vivos (Chinchilla *et al.*, 2007). Londono-Arcilla e colaboradores (2002) demonstraram que a administração de *S. enterica* Typhi CVD 908 expressando a urease de *H. pylori* por via mucosa seguida da administração via parenteral da proteína conferiu uma proteção parcial aos camundongos desafiados com *H. pylori*.

O sucesso da estratégia de “*prime-boost*” heterólogo também tem sido ilustrado em ensaios com vacinas antimaláricas pré-eritocíticas (Epstein *et al.*, 2004, Moorthy *et al.*, 2004b, Wang *et al.*, 2004). Voluntários que foram imunizados via parenteral com uma vacina de DNA codificadora da proteína CSP de *P. falciparum* seguida de um *boosting*, também via parenteral, com a RTS,S/AS02A produziram IFN- γ , anticorpos específicos e resposta de células TCD8⁺, fato não observado em voluntários imunizados somente com a vacina de DNA ou com a RTS,S/AS02A, demonstrando que esse regime de vacinação pode ser utilizado para induzir uma imunidade mais robusta contra a malária (Epstein *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004).

Corroborando com os fatos apresentados acima, Chinchilla e colaboradores (2007) demonstraram que o regime de “*prime-boost*” heterólogo combinando a administração via

mucosa de uma linhagem atenuada de *S. enterica* Typhi que expressava e exportava a proteína CS de *P. falciparum*, seguida da administração via parenteral de uma vacina de DNA codificando para CSP foi capaz de induzir anticorpos séricos e células T específicos. O mesmo não ocorreu na ausência do *priming* com o vetor vivo, sugerindo que esse regime de vacinação pode ser uma estratégia promissora no desenvolvimento de uma vacina para a malária.

Os experimentos em modelo animal estão em fase inicial e aguardando posicionamento do comitê de ética da Unicamp. Após a realização dos experimentos para confirmar a melhora dos níveis de expressão de *m2*, a estratégia de imunização por “*prime-boost*” deverá ser adotada, e será comparada a vacinação utilizando-se apenas da bactéria, em duas doses.

6. CONCLUSÕES

Até o presente momento, não fomos capazes de comprovar melhora na expressão do domínio M2 de MAEBL em nossas linhagens. Entretanto tivemos grandes avanços no que diz respeito à produção de linhagens vacinais, pois conseguimos com sucesso a estabilização de plasmídios carreadores de antígenos heterólogos em nossas novas linhagens atenuadas. Os próximos passos serão fundamentais para comprovar se as modificações feitas na seqüências (otimização), nos vetores de expressão (remoção do promotor do gene *asd*), e na forma como a expressão é regulada (utilização de promotor induzível *in vivo*) surtiram o efeito desejado. Uma boa resposta a este novo sistema poderia abrir novas portas na busca por uma vacina eficaz contra a malária.

7. REFERÊNCIAS

- Adamns, J.H.; Blair, P.L.; Kaneko, O.; Peterson, D.S. 2001. An expanding *ebf* family of *Plasmodium falciparum* *Trends in Parasitol.* 17: 297 – 299.
- Alonso, P.L.; Sacarlal, J.; Aponte, J.J.; Leach, A.; Macete, E.; Milman, J.; Mandomando, I.; Spiessens, B.; Guinovart, C.; Espasa, M.; Bassat, Q.; Aide, P.; Ofori-Anyinam, O.; Navia, M.M.; Corachan, S.; Ceuppens, M.; Dubois, M.C.; Demoitié, M.A.; Dubovsky, F.; Menéndez, C.; Tornieporth, N.; Ballou, W.R., Thompson, R.; Cohen, J. 2004. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*: 364: 1411-20.
- Andrews-Polymenis, H.L., Baumler, A.J., McCormick, B.A., and F. Fang (2010) Taming the Elephant: Frontiers in *Salmonella* Biology, Pathogenesis and Prevention. *Infect. Immun.* 78(6) p. 2356-2369.
- Atkins, H.S.; Morton, M.; Griffin, K.F.; Stokes, M.G.M.; Nataro, J.P.; Titball, R.W. 2006. Recombinant *Salmonella* vaccines for biodefence. *Vaccine*. 24: 2710 – 2717.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2^a ed. John Wiley & Sons. 2003. 600p.
- Baird, J.K.; Jones, T.R.; Danudirgo, E.W.; Annis, B.A.; Bangs, M.J.; Basri, H. *et al.* 1991. Age-dependent acquired immunity against *Plasmodium falciparum* among people with 2 years exposure to hyperendemic malaria. *Am. J. Tropical Med. Hyg.* 45: 65.

- Bargieri, D.Y., Soares, I.S., Costa, F.T.M., Braga, C.J., Ferreira, L.C.S., Rodrigues, M.M., 2011. Malaria Vaccine Development: Are Bacterial Flagellin Fusion Proteins the Bridge between Mouse and Humans? *J Parasitol Res.* 2011: 1-10.
- Beuzón, C. R., Banks, G., Deiwick, J., Hensel, M., & Holden, D. W. 1999. pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbial.*, 33(4), 806-16.
- Bjorkman, J.; Hugles, D.; Andersson, D.I.. 1998. Virulence of antibiotic resistant *Salmonella Typhimurium*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95: 3949-3953.
- Blackman, M.J.; Bannister, L.H. 2001. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 117: 11 -25.
- Bojang, K.A. 2006. RTS,S/AS02A for malaria. *Expert Rev Vaccines.* 5: 611-5.
- Brandão, L.G., 2002. Comparação entre promotores regulados por PhoP/Q por meio da expressão de GFPmut3(*): Construção de um sistema plasmidial para expressão estável de antígenos heterólogos em linhagens atenuadas de *Salmonella enterica Typhimurium*. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Brocchi, M.; Covone, M.G.; Palla, E.; Galeotti, C.L. 1999. Integration of minitransposon for expression of the *Escherichia coli elt* gene at a preferred site in *Salmonella typhimurium* identifies a novel putative fimbrial locus. *Archives of Microbiology.* 171: 122-126.
- Bueno, S.M.; González, P.A.; Kalergis, A.M. 2009. Use of genetically modified bacteria to modulate adaptive immunity. *Curr Gene Ther.* 9: 171-84.

- Cárdenas, L.; Clements, J.D. 1992. Oral immunization using live attenuated *Salmonella ssp* as carrier do foreign antigens. *Clin Microbiol. Rev.* 5: 328-42.
- Carvalho, L.J.M.; Daniel-Ribeiro, C.T.; Goto, H. 2002. Malaria vaccine: candidate, antigens, mecanismos, constraints and prospects. *Scand. J. Immunol.* 56, 327-343.
- Cheminay, C.; Hensel, M. 2007. Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *Int.J Med. Microbiol.* 298.
- Cheminay, C., & Hensel, M. 2008. Rational design of Salmonella recombinant vaccines. *Int. J. Med. Microbiol.*, 298, 87-98.
- Chinchilla, M.; Pasetti, M.F.; Medina-Moreno, S.; Wang, J.Y.; Gomez-Duarte, O.G.; Stout, R.; Levine, M.M.; Galen, J.E..2007. Enhanced immunity to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (PfCSP) by using *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing PfCSP and a PfCSP-encoding DNA vaccine in a heterologous prime-boost strategy. *Infect.Immun.* 75: 3769–3779.
- Collins, C.R.; Withers-Martinez, C.; Hackett, F.; Blackman, M.J. 2009. An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. *PLoS Pathog* 5: 1000273.
- Collins, W.E.; Contacos, P.G. 1972. Immunization of monkeys against *Plasmodium cynomolgi* by X-irradiated sporozoites. *Nature New Biology.* 236: 176.
- Collins, W.E.; Barnwell, J.W. 2008. A Hopeful Beginning for Malaria Vaccines. *N Engl J Med.* 359: 2599-601.

- Covone, M.G.; Brocchi, M.; Palla, E.; Silveira, W.D.; Rappuoli, R. And Galeotti, C.L. 1998. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 66: 224-231.
- Cunnington, A.J., de Souza, J.B., Walther, R.-M. & Riley, E.M., 2012. Malaria impairs resistance to *Salmonella* through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization. *Nat. Med.* 18, 120–127.
- Curtiss, R. 3rd.; Galan, J.E.; Nakayama, K.; Kelly, S.M. 1990. Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains *in vivo*. *Res Microbiol.* 141: 797-805.
- Curtiss, R., Xin, W., Li, Y., Kong, W., Wanda, S.-Y., Gunn, B., & Wang, S. 2010. New technologies in using recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Critical reviews in immunology*, 30(3), 255-70.
- Datsenko, K.A.; Wanner, B.L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 6640-5.
- Dillon SC, CJ Dorman. 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol*, 8: 185-195.
- Dorman CJ. 2009. Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology. *Adv Appl Microbiol*, 67: 47-64.
- Dunstan, S.J.; Simmons, C.P.; Strugnell, R.A. 2003. *In vitro* and *in vivo* stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *Immunol. Med. Microbiol.* 186: 240-245.

- Egan, A.F.; Burghaus, P.; Druilhe, P.; Holder, A.A.; Riley, E.M.. 1999. Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro. *Parasite Immunol.*
- Epstein, J. E., Tewari, K., Lyke, K. E., Sim, B. K. L., Billingsley, P. F., Laurens, M. B., Gunasekera, a, et al. (2011). Live Attenuated Malaria Vaccine Designed to Protect through Hepatic CD8+ T Cell Immunity. *Science* (New York, N.Y.), 475.
- Everest, P.; Frankel, G.; Li, J.; Lund, P.; Chatfield, S.; Dougan, G. 1995. Expression of LacZ from the *htrA*, *nirB* and *groE* promoters in a *Salmonella* vaccine strain:influence of growth in mammalian cells. *Microbiol. Lett.*37: 111-119.
- Fayolle,C.; O'Callaghan,D.; Martinaeu, P.; Charbit, A.; Clément, J.M.; Hofnung, M.; Leclerc, C. 1994. Genetic control of antibody response induced against an antigen delivered by recombinant attenuated *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 62: 4310-19.
- Feachem, R. G. a, Phillips, A. a, Hwang, J., Cotter, C., Wielgosz, B., Greenwood, B. M., Sabot, O., et al. (2010). Shrinking the malaria map: progress and prospects. *Lancet*, 376(9752), 1566-78.
- Fernandes, S.A.; Tavechio, A.T.; Ghilardi, A.C.; Dias, A.M.; Almeida, I.A.; Melo, L.C. 2006. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 48: 179-84.

- Florens, L., Washburn, M. P., Raine, J. D., Anthony, R. M., Grainger, M., Haynes, J. D., Moch, J. K., et al. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, 419(6906), 520-6.
- Franzin, F. M. 2009. Construção e análise da imunogenicidade de uma linhagem atenuada de *Salmonella enterica* produtora do domínio M2 do antígeno MAEBL de *Plasmodium yoelii*. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Freitas, L.F.; Chaves, G.C.; Wannmacher, L.; Osorio-De-Castro, C.G. 2007. Uncomplicated *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* malaria in Brazil: evidence on single and combined drug treatments recommended by official guidelines: *Cad Saúde Publica*. 23: 2285-94.
- Galán JE, Nakayama K, Curtiss R 3rd. 1990. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene*. 94: 29-35.
- Galen, J.E.; Pasetti, M.F.; Tennant, S.; Ruiz-Olvera, P.; Sztein, M.B.; Levine, M.M. 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines finally come of age. *Immunol Cell Biol*. 87: 400-12.
- Ghai, M.; Dutta, S.; Hall, T.; Freilich, D.; Ockenhouse, C.F. 2002 Identification, expression, and functional characterization of MAEBL, a sporozoite and asexual blood stage chimeric erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 123: 35- 45.

- Goosen, N.; Van de Putte, P. 1995. The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol Microbiol* 16: 1–7.
- Guzman, C. A., Borsutzky S., Griot-Wenk M., Metcalfe I. C., Pearman J., Collioud A., Favre D., Dietrich G. 2006. Vaccines against typhoid fever. *Vaccine*, 24: 3804-11.
- Hofer, E.; Dos Reis E. M. 1994. *Salmonella* serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 36: 7-9.
- Holder, A.A.; Taylor, H.M.; Triglia, T.; Thompson, J.; Sajid, M.; Fowler, R.; Wickham, M.E.; Cowman, A.F. 2001. *Plasmodium falciparum* Homologue of the Genes for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* Adhesive Proteins, Which Is Transcribed but Not Translated. *Infect Immun.*69: 3635- 3645.
- Hone, D.; Attridge, S.; Van Den Bosch, L.; Hackett, J. 1988. A chromosomal integration system for stabilisation of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strains. *Microb. Pathog.*5:.407-418.
- Husseiny, M.; Hensel, M. 2005. Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium vaccine carrier strains. *Infect. Immun.* Mar: 1598 – 1605.
- Husseiny, M. I., & Hensel, M. (2009). Evaluation of *Salmonella* live vaccines with chromosomal expression cassettes for translocated fusion proteins. *Vaccine*, 27(28), 3780-7.
- Jay, J. M. Modern Food Microbiology. In: (Ed.). Maryland: Aspen Publishers Inc., 2000. Modern Food Microbiology, p.511-525.

- Kang HY, Srinivasan J, Curtiss R 3rd. 2002. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine. *Infect Immun.* 70:1739-49.
- Kappe, S.H.; Curley, G.P.; Noe, A.R.; Dalton, J.P.; Adams, J.H. 1997. Erythrocyte binding protein homologues of rodent malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89: 137 – 148.
- Kappe, S.H.; Noe, A.R.; Fraser, T.S.; Blair, P.L.; Adams, J.H. 1998. A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 1230-1235.
- Kappe, S.H.; Gardner, M.J.; Brown, S.M.; Ross, J.; Matuschewski, K.; Ribeiro, J.M.; Adams, J.H.; Quackenbush, J. *et al.* 2001. Exploring the transcriptome of the malaria sporozoite stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 9895.
- Kappe, S. H. I., & Mikolajczak, S. a. (2011). Another Shot at a Malaria Vaccine. *Science*, 334(6055), 460-461.
- Karem, K.L.; Chatfield, S.; Kuklin, K.; Rouse B.T.. 1995. Differential induction of carrier antigen-specific immunity by *Salmonella typhimurium* live-vaccine strains after single mucosal or intravenous immunization of BALB/c mice. *Infec. Immun.* 63: 4557–4563.
- Kariu, T.; Yuda, M.; Chinzei, Y. 2002. MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J. Exp. Med.* 195: 1317-1323.

- Kelly A, MD Goldberg *et al.* 2004. A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 150: 2037-53.
- Kong, Q., Liu, Q., Roland, K. L., & Curtiss, R. 2009. Regulated delayed expression of *rfaH* in an attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine enhances immunogenicity of outer membrane proteins and a heterologous antigen. *Infect. Immun.*, 77(12), 5572-82.
- Kwon YM, Cox MM, Calhoun LN. 2007. *Salmonella*-based vaccines for infectious diseases. *Expert Rev Vaccines*. 6: 147-52.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685.
- Londono-Arcila, P.; Freeman, D.; Kleanthous, H.A.; O'Dowd, M.; Lewis, S.; Turner, A.K.; Rees, E.L.; Tibbitts, T.J.; Greenwood, J.; Monath, T.P.; Darsley, M.J. 2002. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing urease effectively immunizes mice against *Helicobacter pylori* challenge as part of a heterologous mucosal priming-parenteral boosting vaccination regimen. *Infect. Immun.* 70: 5096–5106.
- 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.* *In press.*

- Lorenz M, A Hillisch *et al.* 1999. Global structure similarities of intact and nicked DNA complexed with IHF measured in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res*, 27: 4619–25.
- MacLennan, C.A., 2012. Host defense against malaria favors *Salmonella*. *Nat. Med.* 18, 21–22.
- Mahoney Rt, Krattiger A, Clemens Jd, Curtiss R. 2007. The introduction of new vaccines into developing countries. IV: Global Access Strategies. *Vaccine*. 25: 4003-11.
- Maloy, S.R. 1996. Genetics analysis of pathogenic bacteria: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mangan, M.W.; Lucchini, S.; Danino, V.; Cróinín, T.O.; Hinton, J.C.; Dorman, C.J. 2006. The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* 59: 1831-47.
- Mangan, M.W.; Lucchini, S.; Cróinín, T.O.; Fitzgerald, S.; Hinton, J.C.; Dorman, C.J. 2011. Nucleoid-associated protein HU controls three regulons that coordinate virulence, response to stress and general physiology in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiol.* 157:1075-1087.
- Marshall, D.G.; Haque, A.; Fowler, R.; Del Giudice, G.; Dorman, C.J.; Douglas, G. ; Bowe, F. 2000. Use of the stationary phase inducible promoters, *spv* and *dps*, to drive heterologous antigen expression in *Salmonella* vaccine strains. *Vaccine*. 18: 1298-1306.
- Mastroeni P.; Maskell D. 2006. *Salmonella infections: Clinical, immunological and molecular aspects*. 1° ed, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Matuschewski, K.; Mueller, A.K. 2007. Vaccines against malaria – an update. *FEBS Journal* 274: 4680–4687.
- McKelvie, N. D., Stratford, R., Wu, T., Bellaby, T., Aldred, E., Hughes, N. J., Chatfield, S. N., et al. 2004. Expression of heterologous antigens in *Salmonella* Typhimurium vaccine vectors using the in vivo-inducible, SPI-2 promoter, ssaG. *Vaccine*, 22(25-26), 3243-55.
- McKelvie, N. D., Khan, S. a, Karavolos, M. H., Bulmer, D. M., Lee, J. J., DeMarco, R., Maskell, D. J., et al. (2008). Genetic detoxification of an *aroA* *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strain does not compromise protection against virulent *Salmonella* and enhances the immune responses towards a protective malarial antigen. *FEMS immunology and medical microbiology*, 52(2), 237-46.
- Medina, E.; Paglia, P.; Rohd, M.; Colombo, M.P.; Guzman, C.A. 2000. Modulation of host immune response stimulated by *Salmonella* vaccine carrier strains by using different promoters to drive the expression of the recombinant antigen. *Eur. J. Immunol.* 30: 768-777.
- Mehlin, C., Boni, E., Buckner, F. S., Engel, L., Feist, T., Gelb, M. H., Haji, L., et al. (2006). Heterologous expression of proteins from *Plasmodium falciparum*: results from 1000 genes. *Molecular and biochemical parasitology*, 148(2), 144-60.
- Miroux B., Walker J.E., 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol.*; 260(3):289-298.

- Moorthy, V.S.; Good, M.F.; Hill, A.V.S.. 2004a. Malaria vaccine developments. *Lancet*. 363: 150-156.
- Moorthy, V.S.; Imoukhuede, E. B.; Keating, S.; Pinder, M.; Webster, D. Skinner, M.A.; Gilbert, S.C.; Walraven, G.; Hill A.V.. 2004b. Phase 1 evaluation of 3 highly immunogenic prime-boost regimens, including a 12-month reboosting vaccination, for malaria vaccination in Gambian men. *J. Infect. Dis.* 189:2213–2219.
- Mota, M.M.; Hafalla, J.C.R.; Rodriguez, A. 2002. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat Medicine*. 8:1318-1322.
- Mota, M.M.; Rodriguez, A.. 2004. Migration through host cells: the first step of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cel Microbiol*. 6: 1113-1118.
- Nakayama, K.; Shiota, S.; Nakayama, H. 1988. Thymineless death in *Escherichia coli* mutants deficient in the RecF recombination pathway. *Can. J. Microbiol*. 34: 905-907.
- Nalin, D.R. 2002. Evidence based vaccinology. *Vaccine*. 20:1624-1630.
- Noe, A.R.; Adams, J.H. 1998. *Plasmodium yoelii* YM MAEBL protein is coexpressed and colocalizes with rhoptry proteins. *Mol. Biochem. Parasitol*. 96: 27.
- Nussenzweig, R.S.; Vanderberg, J.; Most, H.; Orton, C. 1967. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*. 216: 160.
- Ocampo, M.; Curtidor, H.; Vera, R.; Valbuena, J.J.; Rodrigues, L.E.; Puentes, A.; Lopez, R.; Garcia, J.E.; Tovar, D.; Pacheco, P.; Navarro, M.A.; Patarroyo, M.E. 2004. MAEBL

Plasmodium falciparum protein peptides bind specifically to erythrocytes and inhibit *in vitro* merozoite invasion. *BBRC*. 315: 319-329.

Oliveira, A.F.; Ferraz, L.C.; Brocchi, M.; Roque-Barreira, M.C. 2007. Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the VapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus equi*. *Microbes Infect.* 9: 382-90.

Oliveira, A. F., Ruas, L. P., Cardoso, S. a., Soares, S. G., & Roque-Barreira, M.C. (2010). Vaccination of Mice with Salmonella Expressing VapA: Mucosal and Systemic Th1 Responses Provide Protection against *Rhodococcus equi* Infection. *Plos One*, 5(1), e8644.

Pathangey, L., Kohler, J. J., Isoda, R., & Brown, T. a. (2009). Effect of expression level on immune responses to recombinant oral *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccines. *Vaccine*, 27(20), 2707-11.

Popoff, M.Y.; Bockemuhl, J.; Gheesling, L.L. 2004. Supplement 2002 (nº. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol.* 155: 568-70.

Preiser, P.; Kaviratne, M.; Khan, S.; Bannister, L.; Jarra, W. 2000. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect.* 2: 1461.

Preiser, P.; Rénia, L.; Singh, N.; Balu, B.; Jarra, W.; Voza, T.; Kaneko, O.; Blair, P.; Torii, M.; Landau, I.; Adams, J.H. 2004 Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Infect. Immun.* 72: 3604-3608.

- Rieckmann, K.H.; Beaudoin, R.L.; Cassells, J.S.; Sell, K.W. 1979. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. *Bull WHO* 57: suppl 1: 261.
- Sabchaeron, A.; Burnouf, T.; Ouattara, D.; Attanath, P.; Bouharoun-Tayoun, H. 1991. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am. J. Tropical Med. Hyg.* 45: 297.
- Saenz, F.E.; Balu, B.; Smith, J.; Mendonça, S.R.; Adams, J.H. 2008. The transmembrane isoform of *Plasmodium falciparum* MAEBL is essential for the invasion of *Anopheles* salivary glands. *Plos One*.3: e2287.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Silvie O, Rubinstein E, Franetich JF, Prenant M, Belnoue E, Rénia L, Hannoun L, Eling W, Levy S, Boucheix C, Mazier D. 2003. Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat Med.* 9: 93-6.
- Strugnell, R. A.; Maskell, D.; Fairweather, N.; Pickard, D.; Cockayne, A.; Penn, C.; Dougan, G. 1990. Stable expression of foreign antigens from the chromosome of *Salmonella* Typhimurium vaccine strains. *Gene*.88: 57-63.
- Thanbichler M, SC Wang, L Shapiro. 2005. The Bacterial Nucleoid: A Highly Organized and Dynamic Structure. *J Cell Biochem*, 96: 506-21.

- Wang, S., Li, Y., Scarpellini, G., Kong, W., Shi, H., Baek, C.-H., Gunn, B., et al. 2010. *Salmonella* vaccine vectors displaying delayed antigen synthesis in vivo to enhance immunogenicity. *Infect. Immune.*, 78(9), 3969-80.
- Wang S., Li Y., Shi H., Sun W., Roland K. L., Curtiss III R. 2011. Comparison of a Regulated Delayed Antigen Synthesis System with *In Vivo*-Inducible Promoters for Antigen Delivery by Live Attenuated *Salmonella* Vaccines. *Infect. Immune.*, 79(2), 937–949.
- Webster, D.; Hill, A.V.S. 2003. Progress with new malaria vaccines. *Bull WHO.* 81: 902-909.
- Who. 2000. Climate change and malaria: temperatures without fevers?. *Malaria – A global crisis.* Geneva.
- Who. 2006. What is malaria? Disponível em <[http:// w3.who.org/en/Section10/Section21/Section334.htm](http://w3.who.org/en/Section10/Section21/Section334.htm)>. Acesso em: 20/Nov/2007.
- Who. 2008. World Malaria Report. Disponível em <<http://malaria.who.int/wmr2008/malaria2008.pdf>>. Acesso em: 03/Nov/2012.
- Who. 2010. World Malaria Report. Disponível em <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564106/en/index.html>> Acesso em 03/Nov/2012.
- Xin, W., Wanda, S.-Y., Li, Y., Wang, S., Mo, H., & Curtiss, R. (2008). Analysis of type II secretion of recombinant pneumococcal PspA and PspC in a *Salmonella enterica*

serovar Typhimurium vaccine with regulated delayed antigen synthesis. *Infection and immunity*, 76(7), 3241-54.

Yadava, A., & Ockenhouse, C. F. (2003). Effect of Codon Optimization on Expression Levels of a Functionally Folded Malaria Vaccine Candidate in Prokaryotic and Eukaryotic Expression Systems, 71(9), 4961-4969.