

CRISTIANE MOBILON

**“Clonagem molecular do gene *ipaC* de *Shigella sp* e estudo da
expressão por *Lactococcus lactis*”**

**CAMPINAS
2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



CRISTIANE MOBILON

“Clonagem molecular do gene *ipaC* de *Shigella sp* e estudo da expressão por

Lactococcus lactis”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Cristiane Mobilon</i> <i>[Signature]</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microorganismos.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Campinas, 2012

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

M713c Mobilon, Cristiane, 1982-
Clonagem molecular do gene *ipaC* de *Shigella sp* e estudo da expressão por *Lactococcus lactis* / Cristiane Mobilon. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira, Eliana Guedes Stehling.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Shigella flexneri*. 2. Shigelose. 3. Anticorpos. 4. Gene *ipaC*. 5. Vacinas. I. Dias da Silveira, Wanderley, 1956-. II. Stehling, Eliana Guedes. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Molecular cloning and expression analysis in *Lactococcus lactis* of *ipaC* gene from *Shigella sp*

Palavras-chave em Inglês:

Shigella flexneri

Shigellosis

Antibodies

ipaC gene

Vaccines

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Wanderley Dias da Silveira [Orientador]

Marcelo Brocchi

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Marcelo Palma Sircili

Waldir Pereira Elias Junior

Data da defesa: 30-05-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 30 de Maio de 2012

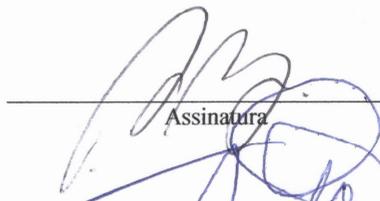
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (Orientador)



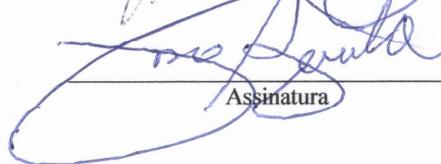
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Assinatura

Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili

Marcelo Palma Sircili

Assinatura

Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior



Assinatura

Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garbogini

Assinatura

Profa. Dra. Janaína Luisa Leite Garbim

Assinatura

Prof. Dr. Angelo Berchieri Júnior

Assinatura

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/UNICAMP**

CERTIFICADO

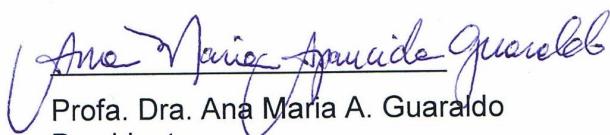
Certificamos que o Protocolo nº 1116-1, sobre "CLONAGEM MOLECULAR DO GENE *ipaC* DE *SHIGELLA sp* E EXPRESSÃO EM *LACTOCOCCUS LACTIS*", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira / Cristiane Mobilon, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 25 de outubro de 2006.

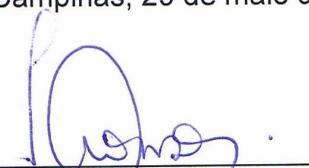
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1116-1, entitled "MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF THE *ipaC* GENE FROM *SHIGELLA sp* AND EXPRESSION IN *LACTOCOCCUS LACTIS*", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on October 25, 2006.

Campinas, 29 de maio de 2012.

2ª. VIA


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, pela vida. Por me proporcionar saúde, sabedoria e perseverança para enfrentar os desafios.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais Luiz Jorge Mobilon e Glória Maria Masserani Mobilon e a minha avó Catarina Amélia Pizzol Masserani pela paciência, compreensão, apoio, carinho, pelo amor incondicional, enfim, por estarem ao meu lado e me apoiarem para que esta conquista tão importante fosse possível e para que o caminho até ela se tornasse mais sereno.

Agradeço ao meu orientador, professor Wanderley Dias da Silveira, em primeiro lugar, por me aceitar como aluna e integrante de sua equipe, e depois, durante o desenvolvimento deste trabalho, pelos ensinamentos, pela paciência, pela compreensão diante das situações adversas que, por vezes, permearam o caminho até aqui.

Agradeço também à minha co-orientadora Eliana Guedes Stehling pelo apoio, pelos ensinamentos, pela amizade.

Agradeço aos professores Vasco Ariston de Carvalho Azevedo e Anderson Miyoshi e a equipe do Laboratório de Genética Celular e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais por me receberem tão atenciosamente, pela oportunidade e por tudo o que aprendi no início do meu trabalho e que foi substancial para sua realização.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Análise Genética e Molecular da Unicamp, em especial a duas pessoas muito queridas: Marcelo Augusto Szymanski de Toledo e Clelton Aparecido dos Santos, pela paciência, pela prontidão em me ajudar e me ensinar sempre, e tornar, de certa forma, o caminho mais fácil e claro.

Agradeço à Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan pelos subsídios concedidos.

Agradeço ao Luis Peroni pelas dicas e esclarecimentos técnicos.

Agradeço ao professor Marcelo Brocchi e ao seu aluno Guilherme Paier Milanez pelos direcionamentos na realização de alguns experimentos.

Agradeço à professora Liana Maria Cardoso Verinaud e a sua aluna Carolina Francelin pelo auxílio tão fundamental para a finalização deste trabalho.

Um agradecimento especial também aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana: Fernanda Laroza Paganelli, Fernanda de Pace, Jacqueline Boldrin de Paiva, Janaina Luíza Leite Garbim, Thaís Cabrera Galvão Rojas, Telma Piascesi, Monique Tiba Ribeiro, Murillo Lino Bution, Victor Gonçalves Maturana, Flávio Silveira, Gerson Nakazato, Izildinha Aparecida Greggio Colli, Ricardo Destéfano e Sandra de Almeida Queiroz por todo o apoio, amizade, enfim, por tudo que compartilhamos ao longo desses anos.

Por fim, faço um agradecimento especial a todos meus amigos, por me trazerem alegria, por proporcionarem bons momentos na minha vida e contribuírem, assim, com meu sucesso, com minha realização pessoal e profissional.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo número: 2007/50431-7) pelo apoio financeiro.

Cortar o tempo

*“Quem teve a idéia de cortar o tempo em fatias,
a que se deu o nome de ano,
foi um indivíduo genial.*

Industrializou a esperança, fazendo-a funcionar no limite da exaustão.

*Doze meses dão para qualquer ser humano se cansar e entregar os pontos.
Aí entra o milagre da renovação e tudo começa outra vez, com outro número e outra
vontade de acreditar que daqui pra diante vai ser diferente.”*

Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
Bactérias do gênero <i>Shigella</i>	3
Epidemiologia.....	3
Patogenicidade de <i>Shigella</i>	6
Desenvolvimento de vacinas contra <i>Shigella</i> : histórico e perspectivas.....	13
Bactérias lácticas.....	15
<i>Lactococcus lactis</i> : características moleculares e potencial vacinal.....	16
JUSTIFICATIVA	19
OBJETIVOS	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
Linhagens bacterianas.....	21
Vetores plasmidiais.....	21
Experimentos – vetor pET28a	22
Extração plasmidial em pequena escala.....	22
Extração de DNA por fervura.....	22
Reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene <i>ipaC</i>	22
Digestão dos produtos de PCR e do vetor de expressão.....	23
Ligação do gene <i>ipaC</i> ao vetor pET28a.....	24
Preparo da linhagem de <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) quimiocompetente.....	24
Transformação de <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) quimiocompetente.....	25

Sequenciamento dos clones positivos.....	25
Indução da expressão da proteína IpaC.....	25
Extração da proteína IpaC.....	26
Gel SDS-PAGE para verificação da expressão da proteína IpaC.....	26
Purificação por cromatografia de afinidade.....	27
Espectrometria de massa.....	28
Produção de anticorpos policlonais.....	28
Teste de ELISA para a quantificação dos anticorpos.....	29
“Western blot” para a confirmação da produção de anticorpos.....	30
Teste de sensibilidade à gentamicina.....	31
Cultivo de células HeLa para o teste de invasão.....	31
Teste de invasão.....	32
Experimentos – vetores pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut.....	33
Extração plasmidial em pequena escala.....	33
Reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene <i>ipaC</i>	33
Digestão dos produtos de PCR e dos vetores de expressão.....	34
Ligação do gene <i>ipaC</i> ao vetores pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut.....	35
Preparo da linhagem de <i>Lactococcus lactis</i> MG1363 eletrocompetente.....	35
Eletroporação de <i>Lactococcus lactis</i> linhagem MG1363.....	35
Sequenciamento dos clones positivos.....	36
Indução da expressão da proteína IpaC.....	37
Extração da proteína IpaC.....	37
Gel SDS-PAGE para verificação da expressão da proteína IpaC.....	38

Coloração de prata do gel SDS-PAGE para verificação da expressão da proteína	
IpaC.....	38
Ensaio de imunoafinidade.....	39
Extração de RNA total.....	40
PCR em tempo real.....	40
Imunocitoquímica.....	41
Experimentos – vetor pIDTBlue.....	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

RESUMO

A shigelose, uma infecção intestinal grave, causada por bactérias Gram-negativas pertencentes ao gênero *Shigella*, é uma patologia com incidência significativa, principalmente em países em desenvolvimento, onde ocorrem 99% dos casos relatados, sendo que, 69% deles acometem crianças menores de 5 anos de idade. A alta incidência de *Shigella* em países em desenvolvimento é, geralmente, atribuída à falta de saneamento básico, condições de higiene inadequadas, subnutrição e alto custo dos antimicrobianos. O modo predominante de transmissão ocorre por via fecal-oral. Os mecanismos de patogenicidade descritos para as diferentes espécies de *Shigella* incluem numerosos genes de virulência, sendo a maioria encontrada em um plasmídio (pINV) de 220 kb. O plasmídio pINV de *S. flexneri* codifica 2 operons cruciais para seu fenótipo invasivo: o operon *ipa* e o operon *mxi-spa*. O operon *ipa* codifica os antígenos plasmidiais de invasão denominados IpaA, IpaB, IpaC e IpaD, os quais são efetores para o processo de invasão bacteriana. O operon *mxi-spa* juntamente com as proteínas IpaB, IpaC e IpaD são essenciais para a invasão *in vitro* de células epiteliais. Sabe-se, também, que essas proteínas, ou antígenos plasmidiais de invasão, podem ser altamente imunogênicos. Neste trabalho, clonou-se o gene *ipaC* no vetor pET28a para expressão em *Escherichia coli* e em vetores constitutivos para bactérias lácticas com a finalidade de se verificar a capacidade imunogênica da proteína expressa por este gene. Além disso, verificou-se que os anticorpos produzidos pela resposta à proteína IpaC foram capazes de inibir a adesão e invasão de *Shigella flexneri* em culturas celulares cultivadas *in vitro* confirmando, assim, a importância dessa proteína no processo invasivo da bactéria e seu possível uso no desenvolvimento de futuras vacinas a serem usadas contra a shigelose.

Palavras-chave: *Shigella flexneri*; shigelose; anticorpos; IpaC; vacina.

ABSTRACT

Shigellosis is a severe intestinal infection caused by Gram-negative bacteria which belongs to the genus *Shigella*. It is a pathology with high incidence and it is known that 99% of cases occur in underdevelopment countries. Among these cases, 69% of them affect children under 5 years old. The high incidence of *Shigella* in underdevelopment countries, is mainly attributed to substandard hygiene, unsafe water supplies, subnutrition and antibiotic high cost. The predominant mode of transmission is by fecal-oral contact. The pathogenicity mechanisms described for *Shigella* species include several virulence genes, most of them been encoded in a plasmid (pINV) with 220 kb. This plasmid encodes 2 important operons which are essential for the invasive phenotype: the operon *ipa* and the operon *mxi-spa*. The *ipa* operon encodes the invasion plasmid antigens called IpaA, IpaB, IpaC and IpaD, which are effector proteins required for the bacteria invasion process. The *mxi-spa* operon together with IpaB, IpaC and IpaD are essential to epithelial *in vitro* cell invasion. It is also known that these proteins or invasion plasmid antigens may be highly immunogenic. During the development of this work, *ipaC* gene was cloned in the plasmidial vector pET28a for expression in *Escherichia coli* and in constitutive vectors for lactic acid bacteria to prove its immunogenic importance. Furthermore it was verified that the antibodies produced in response to IpaC protein were able to inhibit *Shigella flexneri* adhesion and invasion in *in vitro* cultured cells, confirming its important role in bacteria invasion process and its possible usage in vaccine development against shigellosis.

Keywords: *Shigella flexneri*; shigellosis; antibodies; IpaC; vaccine.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Shigella*

O gênero *Shigella*, pertencente à família Enterobacteriaceae, é constituído por bactérias gram-negativas, anaeróbias facultativas. Estas bactérias compartilham características com aquelas do gênero *Escherichia*, com estudos moleculares indicando uma alta proximidade genética entre as mesmas (Wei *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2002). Classicamente, o gênero é formado por 4 espécies; *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* e *S. dysenteriae* as quais são, ainda, divididas em sorotipos baseados em diferenças bioquímicas e variações em seus antígenos O. As diferentes espécies de *Shigella* causam diarreia caracterizada por diarreia líquida inicial, seguida, nos casos mais graves, pela produção de fezes contendo pús, muco e sangue. A diarreia inicial é devida à intensa reação inflamatória causada por estes microrganismos quando da invasão das células epiteliais da mucosa intestinal. A continuidade do processo infeccioso, com a formação de abscessos e ulcerações, causa o segundo tipo de diarreia, denominada disenteria. O processo infeccioso total, com a produção de fezes características mais dor abdominal intensa e cólica denomina-se shigelose.

Epidemiologia

A shigelose representa uma doença de alto impacto à saúde pública, principalmente em países menos desenvolvidos. A doença atinge, por ano, aproximadamente 165 milhões de pessoas, sendo 163 milhões de casos em países em desenvolvimento e 1,5 milhão em países

desenvolvidos. Dentre todos esses casos, estima-se que 1,1 milhão de pessoas morrem vítimas da doença.

A alta incidência de *Shigella* em países em desenvolvimento é, geralmente, atribuída à falta de saneamento básico, condições de higiene inadequadas, subnutrição e alto custo dos antibióticos, sendo que a bactéria, nas últimas décadas, tem se tornado resistente à maioria dos antibióticos mais utilizados como ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina e trimetoprima-sulfametoxazol (Ahkenazi *et al.*, 2003; Pickering, 2004). A transmissão ocorre por via fecal-oral, sendo agravada por hábitos de higiene precários ou por contato direto com pessoas infectadas.

Dentre as espécies de *Shigella*, *S. flexneri* é endêmica na maioria dos países em desenvolvimento, sendo responsável por um maior índice de morbi-mortalidade (Bennish e Wojtyniak, 1991). A frequência de cada uma das espécies é de: 60% para *S. flexneri*, 15% para *S. sonnei*, 6% para *S. boydii* e 6% para *S. dysenteriae* em países em desenvolvimento e 16, 77, 2 e 1% em países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento, o sorotipo predominante de *S. flexneri* é o 2a seguido do 1b, 3a, 4a e 6 (Kotloff *et al.*, 1999; Souza, 2001). A determinação dos diferentes sorotipos ocorre de acordo com a estrutura do antígeno O, sendo que já foram determinados 49 diferentes sorotipos dos quais 15 pertencem à *S. flexneri*, 20 sorotipos de *S. boydii*, 15 de *S. dysenteriae* e um sorotipo de *S. sonnei* (Levine *et al.*, 2007; Simons and Romanowska, 1987; Bopp *et al.*, 2003).

No Programa Brasileiro de Vigilância para *Shigella* conduzido pelo Laboratório Nacional de Referência para Cólera e Doenças Entéricas (Fiocruz, Ministério da Saúde, Brasil), *S. flexneri* foi a espécie predominante (~53%) durante o período estudado, seguida por *S. sonnei* (~44%). Esses dados contrastam com estudos de outros lugares do Brasil, que detectaram *S. sonnei* como a espécie mais frequente: Ribeirão Preto-SP (Medeiros *et al.*,

2001) e Salvador-BA (Diniz-Santos *et al.*, 2005). No entanto, os dados obtidos por Peirano *et al.* (2006) confirmam a prevalência de *S. flexneri* assim como ocorre com outros estudos desenvolvidos em diferentes regiões brasileiras: Porto Alegre-RS (Santos *et al.*, 1997) São José do Rio Preto-SP (Almeida *et al.*, 1998) e região Nordeste (Lima *et al.*, 1995) e em outros países da América do Sul como Argentina (Merino *et al.*, 2004), Peru (Jones *et al.*, 2004) e Chile (Fulla *et al.*, 2005). Ainda de acordo com os resultados obtidos por Peirano *et al.* (2006) existem algumas diferenças no isolamento geográfico de *Shigella* dentre as regiões brasileiras: os casos envolvendo *S. flexneri* foram mais incidentes no Nordeste e os casos envolvendo *S. sonnei* prevaleceram na região Sudeste. É importante destacar que essas duas regiões brasileiras são muito distintas em relação às condições sociais e econômicas, sendo a região Sudeste composta de cidades com nível de desenvolvimento superior quando comparadas às cidades que compõem a região Nordeste. Esses dados assemelham-se às condições globais de ocorrência das diferentes espécies de *Shigella* uma vez que em países desenvolvidos, a prevalência é de *S. sonnei*, enquanto que nos países em desenvolvimento, a prevalência é de *S. flexneri* (Kotloff *et al.*, 1999; Souza, 2001). Além disso, constatou-se uma baixa ocorrência de *S. boydii* e de *S. dysenteriae* e os sorotipos 2a e 1b de *S. flexneri* ocorreram com as frequências de 59 e 21%, respectivamente.

Em outro trabalho publicado por Orlandi *et al.* (2006), resultado de uma análise de dois anos na Seção de Emergência do Hospital Infantil Cosme Damião em Porto Velho-RO, os casos de gastroenterite causados por *Shigella* spp. representam a quarta maior causa de diarreia, precedida apenas por rotavírus, *E. coli* associada à diarreia e *Salmonella* sp.

Patogenicidade de *Shigella*

Os mecanismos de patogenicidade descritos para as diferentes espécies de *Shigella* são praticamente os mesmos, com numerosos genes localizados em um plasmídio de alto peso molecular (220 Kb), denominado plasmídio de virulência (pINV). Além destes genes, outros foram localizados em pelo menos 3 ilhas de patogenicidade cromossômicas. Estes genes codificam fatores de virulência tais como, o LPS e genes de regulação dependentes de temperatura (Moss *et al.*, 1999; Rajakumar *et al.*, 1997; Turner *et al.*, 2001; Walker e Verma, 2002).

O plasmídio de virulência de *S. flexneri* codifica 2 loci cruciais para seu fenótipo invasivo: o locus *ipa* e o locus *mxi-spa*. O operon *ipa* codifica os antígenos plasmidiais de invasão altamente conservados, IpaA, IpaB, IpaC e IpaD, os quais são efetores essenciais para o processo de invasão bacteriana (Li *et al.* 1993; Oaks *et al.*, 1986). O operon *mxi-spa* codifica os componentes do sistema de secreção tipo III (TTSS), estrutura parecida com uma agulha que é usada para carrear proteínas, assim como as proteínas Ipa, do citoplasma bacteriano à membrana citoplasmática ou ao citoplasma da célula hospedeira (Hueck, 1998) (Figura 1).

A secreção das proteínas Ipa através do sistema de secreção tipo III é essencial ao processo de invasão e disseminação de *Shigella* no epitélio intestinal (Blocker *et al.*, 1999; Tran Van Nhieu *et al.*, 1999; Kuelzto *et al.*, 2003; Handa *et al.*, 2007). Além disso, a proteína IpaC constitui-se em um fator decisivo para a ocorrência da lise da membrana do fagossomo e para o posterior escape dessa estrutura (Schroeder e Hilbi, 2008).

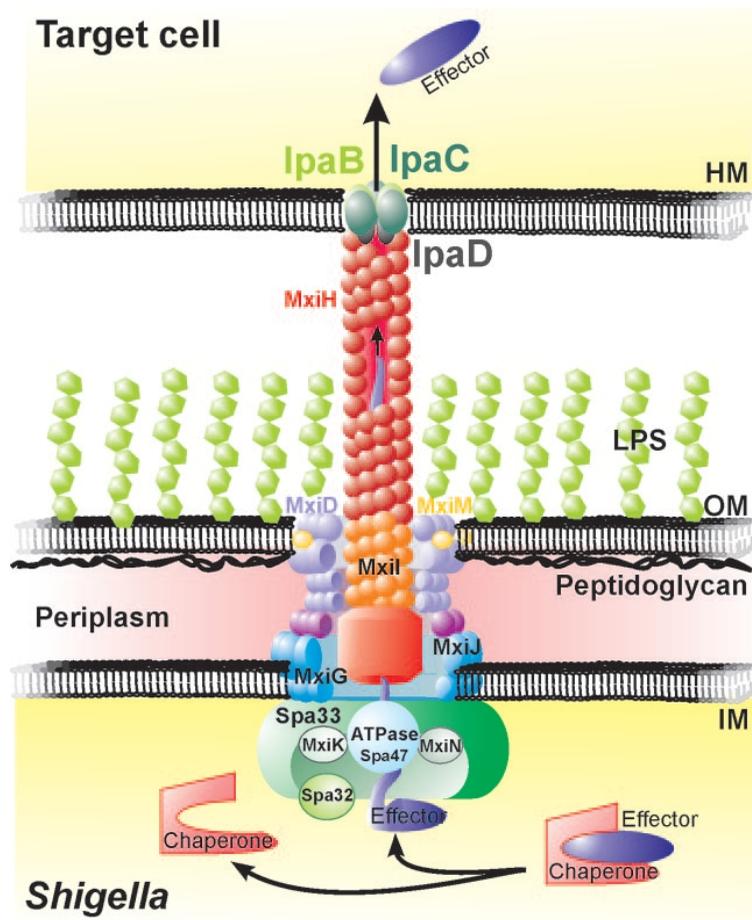


Figura 1. Ilustração esquemática dos componentes do TTSS de *Shigella* spp. (Schroeder e Hilbi, 2008).

Estes genes induzem a invasão bacteriana, através de um processo de macropinocitose, bactéria-induzido onde, rearranjos do citoesqueleto da célula hospedeira englobam a bactéria causando a sua internalização. O vacúolo macropinocítico contendo a bactéria é rapidamente lisado pela invasina IpaB, a qual age como uma toxina que atua diretamente na membrana do fagossomo, liberando a bactérias no citoplasma da célula hospedeira (High *et al.*, 1992). A lise deste fagossomo parece envolver também a IpaC, que é capaz de quebrar os fosfolípidos da membrana através da inserção de suas regiões hidrofóbicas (De Geyer *et al.*, 1997; Kuelzo *et al.*, 2003).

Os mecanismos pelos quais as proteínas Ipa conduzem à invasão bacteriana não são completamente entendidos. Sabe-se que as proteínas Ipa são sintetizadas e armazenadas dentro da bactéria, estando associadas com proteínas chaperoninas até o momento da ativação da secreção pelo contato com a célula hospedeira (Menard *et al.*, 1994a; Menard *et al.*, 1994b; Page *et al.*, 2002). Uma vez ativada a secreção pelo contato com uma célula epitelial, a região N-terminal da IpaC liga-se à IpaB formando um complexo protéico que é inserido na membrana celular do hospedeiro para a formação de um poro (Harrington *et al.*, 2003; Blocker *et al.*, 1999). O domínio C-terminal da proteína IpaC ativa Rho GTPases da célula hospedeira, disparando a polimerização da actina e de extensões filopodiais na proximidade da bactéria. Os rearranjos do citoesqueleto induzidos por estas proteínas resultam na internalização da bactéria, pela célula epitelial, no interior de um vacúolo macropinocítico (Tran Van Nhieu *et al.*, 1999).

Quando *Shigella* entra em contato com as células epiteliais, o sistema de secreção tipo III é estimulado e libera efetores dentro da célula hospedeira. Esses efetores secretados são capazes de modular várias funções do hospedeiro as quais estão envolvidas no remodelamento da arquitetura das células hospedeiras e nos mecanismos de escape do sistema imune inato da célula. Os efetores de *Shigella* como IpaA, IpaB, IpaC, IpgB1, IpgD e VirA, secretados via TTSS, estão envolvidos na estimulação da reorganização de F-actina e de microtúbulos, o que dispara a captura bacteriana pelas células hospedeiras (Enninga *et al.*, 2005). IpaC, é integrada à membrana plasmática da célula hospedeira sendo capaz de levar diretamente à alteração da actina por mecanismo(s) ainda desconhecido(s) (Kuelto *et al.*, 2003).

O processo invasivo de *S. flexneri* inicia-se no momento em que as células M, das placas de Peyer, realizam sua função de reconhecimento e transporte de antígenos

provenientes da luz intestinal através da barreira epitelial. Esses antígenos são internalizados por macrófagos os quais aguardam para desencadear uma resposta imune a partir do reconhecimento desses antígenos (Neutra *et al.*, 1996). Tal propriedade de transporte das células M é explorada por muitos patógenos, inclusive membros do gênero *Shigella*, como uma rota de invasão através de um epitélio praticamente impermeável (Wassef *et al.*, 1989).

Os membros do gênero *Shigella* invadem as células M pelo mesmo processo de rompimento de membrana que é observado na invasão de células epiteliais (Sansoneetti e Phalipon, 1999). Uma vez internalizadas por um vacúolo endocítico gerado pela célula M, as bactérias são translocadas dentro da célula e entram em contato com os macrófagos, os quais disparam processos de reconhecimento imune, sendo incapazes de fagocitar estas bactérias. A partir destes macrófagos, que entram em processo de apoptose, as células bacterianas são capazes de cruzar o epitélio folicular associado, ligando-se à membrana basolateral das células epiteliais efetivando o processo de invasão.

Nos estágios mais avançados do processo infeccioso, as bactérias causam uma resposta inflamatória no hospedeiro amplificando, assim, a invasão bacteriana. A partir deste ponto, pode ocorrer bacteremia causada, ou pela própria *Shigella*, ou por bactérias presentes na luz intestinal. A continuidade deste processo pode levar, em casos de pacientes com deficiências nutricionais, ou imunológicas, à ocorrência de sepse potencialmente fatal.

Dentro deste quadro, durante a indução de apoptose dos macrófagos infectados, ocorre a secreção de concentrações significativas de IL-1, que atrai poli-morfonucleares (PMNs) ao local da infecção, causando uma reação inflamatória responsável pela diarreia inicial observada e, posteriormente, pelo desenvolvimento da shigelose (Sansoneetti *et al.*, 1995; Sansoneetti e Phalipon, 1999).

Adicionalmente à secreção de IL-1, a invasão por *Shigella* ativa a secreção de IL-8. Essa molécula tem quimiotaxia por PMNs, desempenhando também um papel importante na resposta imune inata através do recrutamento dessas células para o local da infecção. Os polimorfonucleares migram através do epitélio no sentido da luz intestinal a fim de combater as bactérias que ainda não invadiram a barreira epitelial (Beatty e Sansonetti, 1997). O influxo de células PMNs através do epitélio em resposta à *Shigella* danifica a integridade desse epitélio permitindo a entrada de mais bactérias presentes na luz em um mecanismo que ocorre independentemente da presença de células M (Perdomo *et al.*, 1994). A figura 2 ilustra o mecanismo de invasão de *Shigella* spp.

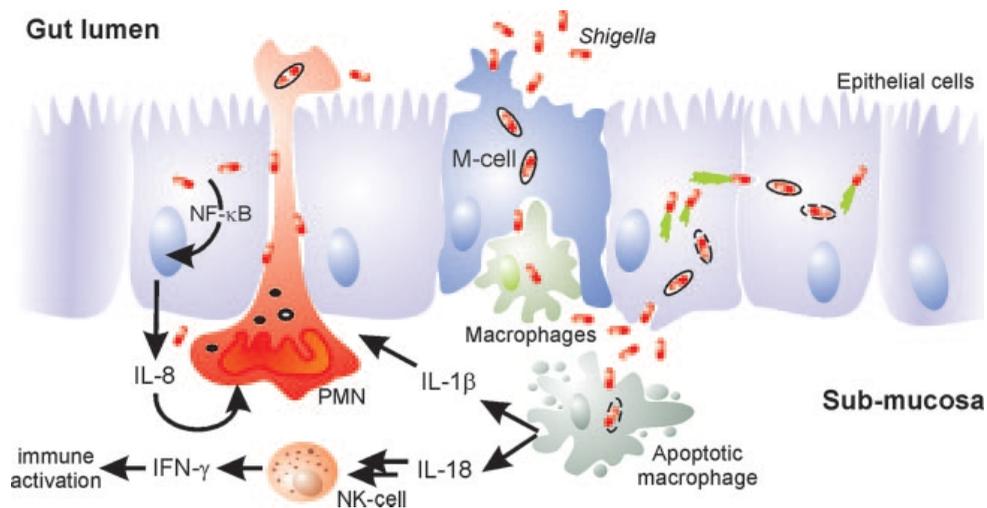


Figura 2. Ilustração esquemática do processo invasivo de *Shigella* spp. (Schroeder e Hilbi, 2008)

Não se sabe ao certo porque as bactérias invadem preferencialmente a face baso-lateral das células epiteliais. Provavelmente, tal característica está relacionada à alta concentração de muco recobrando essas células, funcionando como uma barreira física que dificulta a entrada de *S. flexneri* pela membrana apical e interfere na liberação dos antígenos plasmidiais de invasão (Ipa) pelo sistema de secreção tipo III, os quais, como já discutido,

são requeridos pela bactéria para sua entrada na célula epitelial (Nutten *et al.*, 2002). Sabe-se, também, que o sistema de secreção tipo III (TTSS) requer contato direto com a célula hospedeira para disparar a secreção de invasinas Ipa (Menard *et al.*, 1994a).

A inflamação severa gerada pela shigelose pode persistir por mais de um mês, estimulando a liberação de várias citocinas (IL-1, TNF- α , IL-6, IFN- γ , TNF- β , IL-4, IL-10, TGF- β e IL-8) (Raqib *et al.*, 1995). Embora alguns dos sintomas clínicos da shigelose estejam diretamente relacionados à ação das citocinas, elas são importantes no controle e na contenção da infecção. Os macrófagos residentes e os monócitos infiltrados são incapazes de matar a *Shigella* em seus fagossomos, sucumbindo à apoptose (Hathaway *et al.*, 2002; Zychlinsky *et al.*, 1992). Neste processo apoptótico, os macrófagos liberam IL-18 que age sobre as células NK, e sobre os linfócitos T, induzindo a produção de IFN- γ (Biet *et al.*, 2002).

Em relação à imunidade celular do hospedeiro contra *Shigella*, pode-se dizer que este tipo de resposta não é tão significativa para esta bactéria quando comparada às respostas contra outras bactérias intracelulares. Estudos têm mostrado a ativação crescente de células T em pacientes acometidos pela shigelose (Islam e Christensson, 2000; Islam *et al.*, 1995; Islam *et al.*, 1996; Zwillich *et al.*, 1989). Estudos sobre o desenvolvimento de vacinas contra *Shigella* mostram que ocorre a produção de determinadas citocinas em resposta aos antígenos da bactéria, o que sugere a participação de linfócitos Th1 e Th2 (Kotloff *et al.*, 2000; van de Verg *et al.*, 1995). Além disso, pacientes debilitados pela síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), os quais são deficientes em células T CD4+, mostram grande susceptibilidade à shigelose, o que indica que a imunidade mediada por células pode ter um papel importante na proteção contra a infecção por *Shigella* (Nelson *et al.*, 1992).

Dados sugerem que a resposta humoral é o componente mais significativo da imunidade protetora contra *Shigella*, sendo ambas as respostas, sistêmica e de mucosa, ativadas contra o LPS e contra algumas das proteínas, como as proteínas Ipa, codificadas pelo plasmídeo pINV. A importância da resposta mediada por anticorpos contra a infecção por *Shigella* foi confirmada por um estudo que mostrou que a susceptibilidade de crianças à shigelose é decorrente do fato de ainda não terem desenvolvido uma imunidade humoral efetiva (Raqib *et al.*, 2002). Ainda, dentro deste quadro, sabe-se que os anticorpos IgG, IgM e IgA estão implicados no desenvolvimento da imunidade sorotipo-específica contra *S. flexneri*. Embora a shigelose seja, geralmente, uma infecção localizada, são detectados anticorpos séricos IgG e IgM em resposta ao LPS e a antígenos plasmidiais de invasão (Cohen *et al.*, 1989; Islam *et al.*, 1997; Oberhelman *et al.*, 1991; Oaks e Turbyfill, 2006; van de Verg *et al.*, 1992). A resposta de mucosa através da produção de anticorpos IgA constitui-se em uma característica muito importante no desenvolvimento de uma vacina, por exemplo, uma vez que sua produção representa 70% de todas as imunoglobulinas produzidas nos mamíferos e uma vez que seu papel é formar a linha de frente na defesa contra a adesão e invasão do epitélio intestinal por patógenos, além de neutralizar as toxinas elaboradas por eles (Cerutti, 2008).

A partir do entendimento da maioria dos mecanismos utilizados por *Shigella* para a invasão epitelial e posterior estabelecimento dentro do epitélio intestinal humano, muitos antimicrobianos foram desenvolvidos a fim de impedir a ação e a multiplicação desta bactéria. No entanto, *S. flexneri* está ampliando seu espectro de resistência aos antimicrobianos mais utilizados (Ashkenazi *et al.*, 2003). Conseqüentemente, a Organização Mundial de Saúde tem priorizado o desenvolvimento de uma vacina segura e efetiva contra os sorotipos prevalentes de *S. flexneri*, a fim de minimizar os problemas

decorrentes da manifestação da bactéria uma vez que essa espécie é responsável por 30 a 60% dos casos de shigelose (Kotloff *et al.*, 1999).

Desenvolvimento de vacinas contra *Shigella*: histórico e perspectivas

As proteínas Ipa, especialmente IpaB e IpaC, são reconhecidas como antígenos dominantes por humanos e macacos infectados com bactérias do gênero *Shigella* (Dinari *et al.*, 1987; Formal *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994; Oaks *et al.*, 1986). Os dados obtidos por Turbyfill *et al.* (1995) mostram que existem três famílias de epítomos na proteína IpaC e que a resposta imunológica mediada por anticorpos para essas regiões pode estar relacionada aos sintomas do hospedeiro após a infecção por *Shigella*. Ainda de acordo com este trabalho que foi baseado em testes com macacos Rhesus, pôde-se observar que, depois de infectados com *S. flexneri* 2a, todos eles produziram anticorpos que reagiram contra a proteína IpaC (Turbyfill *et al.*, 1995). Ainda em relação à importância dos antígenos plasmidiais de invasão, um trabalho de Thiem *et al.* (2004) destacou que a detecção dos genes *ipa* (que codificam aqueles antígenos) representa uma ferramenta excelente para o diagnóstico de shigelose.

Durante décadas diversas abordagens têm sido investigadas no desenvolvimento de uma provável vacina contra *Shigella*, entre elas, a utilização de bactérias vivas atenuadas, de células bacterianas mortas, de subunidades proteicas (Levine *et al.*, 2007; Kaminski e Oaks, 2009) e através da deleção de genes envolvidos no metabolismo bacteriano (*guaBA*), na difusão inter celular (*virG*) e na produção de toxinas (*sen*, *set* e *stxA*). CVD 1208 é um protótipo de uma vacina contra *S. flexneri* 2a que apresenta deleções em *guaBA*, *sen* e *set*. Em testes já realizados, essa candidata a vacina mostrou-se bem tolerada e capaz de ativar o sistema imunológico (Kotloff *et al.*, 2004).

Já foi proposto também o uso de um complexo de invasão macromolecular, isolado de uma linhagem virulenta de *Shigella* contendo as proteínas IpaB, IpaC e IpaD e o lipopolissacarídeo (LPS) como uma vacina intranasal testada em modelos animais para shigelose (Turbyfill *et al.*, 2000; Oaks e Turbyfill, 2006). A vacina desenvolvida a partir desse complexo invasivo chamado de Invaplex mostrou-se eficaz, reduzindo a degradação e diluição antigênica quando comparada com vacinas administradas via-oral. Além disso, a administração desse tipo de vacina dispensa o uso de agulhas (Davis, 2001). Em relação à imunogenicidade, a vacina Invaplex foi capaz de induzir tanto a resposta humoral como a imunidade celular e promoveu, ao mesmo tempo, a produção de anticorpos IgA, específicos da imunidade protetora de mucosas (Turbyfill *et al.*, 2000; Oaks e Turbyfill, 2006; Kaminski *et al.*, 2006).

Mais recentemente, foram desenvolvidos alguns trabalhos que apresentaram resultados muito satisfatórios e promissores: um trabalho desenvolvido por Bodhidatta *et al.* (2011) baseia-se no uso de *Shigella sonnei* viva atenuada como uma vacina (WRSS1). Essa vacina apresentou uma eficácia de 50% em tailandeses adultos. No outro, Martinez-Becerra *et al.* (2012) desenvolveram um complexo vacinal composto pelas proteínas IpaB, IpaD, utilizadas separadas ou combinadas, coadministradas com uma toxina (Double mutant heat-labile toxin) de *E. coli* utilizada como adjuvante de mucosa. Como modelo animal foram utilizados camundongos, a imunização se deu por via intranasal. Para os desafios utilizou-se a via pulmonar. Os resultados demonstraram intensa produção de anticorpos séricos e de mucosa, além da ocorrência de resposta imune mediada por células-T contra ambas as proteínas, principalmente contra IpaB.

No entanto, apesar de todos os resultados obtidos e dos investimentos dispendidos pelos EUA através da Bill & Melinda Gates Foundation e pela Europa através da

STOPENTERICS, GLOBVACEntVac, não há ainda nenhuma vacina licenciada disponível contra *Shigella*. A existência de diversos sorotipos para esta bactéria dificulta o desenvolvimento de uma vacina segura, eficaz e que tenha um amplo espectro de atuação contra *Shigella* (Levine *et al.*, 2007).

Bactérias lácticas

As bactérias lácticas (LAB) formam um grupo muito heterogêneo de microrganismos que ocupam diversos nichos ecológicos. Esse grupo inclui espécies dos gêneros: *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Stiles e Holzapfel, 1997). Apesar da heterogeneidade os membros do grupo das bactérias lácticas possuem algumas características em comum, como: (i) são Gram-positivas; (ii) anaeróbias facultativas; (iii) não formadoras de esporos; (iv) não móveis; (v) são capazes de converterem açúcares em ácido láctico (Makarova e Koonin, 2007).

Em razão da metabolização de açúcares, principalmente a glicose, essas bactérias podem ser utilizadas na preparação de comidas e bebidas fermentadas, assim como iogurtes, queijos, pães, vinhos, etc, além de propiciarem uma das mais antigas formas de preservação de alimentos (Tailliez, 2001). O processo de preservação não ocorre apenas devido à acidificação do meio resultante do metabolismo das bactérias, mas também pela produção de inúmeros agentes antibacterianos, como bacteriocinas e compostos orgânicos (van de Guchte *et al.*, 2001). Esta ampla utilização na indústria alimentícia confirma uma característica muito importante dessas bactérias lácticas: o fato de não serem patogênicas. Assim, são classificadas como bactérias seguras, recebendo a denominação de “GRAS” – “Generally Recognized As Safe”.

***Lactococcus lactis*: características moleculares e potencial vacinal**

Dentre todas as bactérias lácticas, *Lactococcus lactis* é a espécie melhor caracterizada e constitui-se em um microrganismo modelo, não apenas por sua importância econômica, mas também pelas seguintes características: (i) seu genoma já foi todo sequenciado (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403) (Bolotin *et al.*, 2001); (ii) a manipulação genética é simples; (iii) inúmeras ferramentas genéticas já foram desenvolvidas para essa bactéria (Azevedo e Miyoshi, 2004; de Vos, 1999) e (iv) não possui o lipopolissacarídeo endotóxico LPS (Bahey-El-Din e Gahan, 2010).

Desde a década de 90, muitos estudos consideraram o uso potencial de *L. lactis* para produção e secreção de proteínas recombinantes devido às seguintes razões: não produz endotoxinas (Bolotin *et al.*, 2001); as linhagens utilizadas não produzem protease extracitoplasmática PrtP (Gasson, 1983a) e são desprovidas de plasmídios selvagens (linhagens IL1403 e MG1363) (Gasson, 1983b; Chopin *et al.*, 1984); relativamente poucas proteínas são secretadas por *L. lactis*, sendo apenas uma, Usp45, secretada em quantidades detectáveis (van Asseldonk *et al.*, 1990), este fato faz com que proteínas secretadas sejam purificadas mais facilmente. Além desses fatores, linhagens de *L. lactis* já apresentam inúmeras mudanças obtidas através de engenharia genética que as habilitam na produção de proteínas de valor biotecnológico, tais como enzimas e antígenos (Nouaille *et al.*, 2003).

Até hoje, vários sistemas de expressão têm sido desenvolvidos para *L. lactis* e para outras bactérias lácticas (Norton *et al.*, 1995; Piard *et al.*, 1997; Dieye *et al.*, 2001; Le Loir *et al.*, 2001) com a identificação e isolamento de plasmídios selvagens que foram manipulados pelas técnicas de biologia molecular. Para que as proteínas produzidas através desses sistemas possam desempenhar as funções biológicas desejadas, faz-se necessário um

correto endereçamento desses produtos heterólogos para que atuem no citoplasma, na membrana ou no meio extracelular.

Dentre estes sistemas, um dos mais promissores e eficazes na produção de proteínas heterólogas é o sistema NICE (“Nisin Controlled Expression System”), baseado em genes envolvidos na biossíntese e regulação do peptídeo antimicrobiano nisin (produto do gene *nisA*) (Kuipers *et al.*, 1993). Outro sistema de expressão desenvolvido para bactérias lácticas é o sistema XIES (“Xylose-Inducible Expression System”). Esse sistema mostrou-se muito versátil, podendo ser facilmente induzido e reprimido pela simples adição de xilose ou glicose no meio de cultura, respectivamente (Miyoshi *et al.*, 2004). Além disso, o sistema XIES permite que a proteína produzida seja secretada ou mantida no citoplasma bacteriano.

Dessa forma, a combinação das propriedades compartilhadas pelas bactérias lácticas e das diversas ferramentas oferecidas pela biologia molecular como, por exemplo, a diversidade de sistemas de expressão heteróloga, são fatores que tornam essas bactérias importantes candidatas ao desenvolvimento de vacinas vivas. Estudos mostram que a administração de bactérias lácticas produzindo algum tipo de antígeno pode ativar uma resposta imunológica tanto sistêmica como de mucosa (Robinson *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2003; Xin *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2004).

A maioria dos estudos envolvendo *L. lactis* como vacina viva foi realizada através da utilização do TTFC (fragmento C da toxina tetânica). O TTFC constitui um antígeno altamente imunogênico, sendo verificado um aumento significativo nos níveis de IgA após imunização oral dos camundongos com as linhagens recombinantes produtoras de TTFC (Norton *et al.*, 1995). Em outros trabalhos, linhagens recombinantes de *L. lactis* secretando o antígeno LcrV (Low-calcium response V) de *Yersinia pseudotuberculosis* foram capazes

de proteger os animais desafiados contra a infecção por *Yersinia*. No entanto, a proteção ocorreu apenas quando os animais foram inoculados via intranasal. No desafio via oral o mesmo resultado não foi observado. Isso mostra que a via de administração dos antígenos heterólogos é uma característica muito importante a ser considerada na ativação da resposta imunológica, seja ela sistêmica ou de mucosa (Cortes-Perez *et al.*, 2007; Daniel *et al.*, 2009). Ainda em relação à eficiência das vacinas vivas de *L. lactis*, os resultados mais promissores foram para vacinas contra o HPV (Papiloma Vírus Humano) associado ao câncer de colo de útero (Bermudez-Humaran *et al.*, 2005; Cortes-Perez *et al.*, 2009).

É importante destacar que, embora os trabalhos envolvendo as bactérias lácticas como carreadoras de antígenos tenham priorizado o desenvolvimento de vacinas de mucosas, outros autores têm trabalhado na produção heteróloga de outros tipos de moléculas como alérgenos, enzimas e citocinas (Wells e Mercenier, 2008).

JUSTIFICATIVA

A partir do quadro descrito, a produção de uma vacina segura e eficaz contra *Shigella* constitui, hoje, um fato de grande interesse, com a finalidade de minimizar os problemas decorrentes da infecção por este patógeno que acomete principalmente crianças e idosos nos países em desenvolvimento. Uma vez conhecidos os mecanismos de atuação da bactéria dentro do hospedeiro, e as características das moléculas envolvidas nesses mecanismos, as proteínas Ipa, especialmente a IpaC apresentam-se como possíveis candidatas para o desenvolvimento de uma vacina. Neste trabalho, nos propusemos a clonar e expressar o gene *ipaC* de *Shigella flexneri* em uma linhagem de *Lactococcus lactis* e em uma linhagem de *Escherichia coli*, com a finalidade de verificar se os produtos da expressão heteróloga, quando inoculados em coelhos, promovem a produção de anticorpos bloqueadores das capacidades de adesão e invasão de *S. flexneri* em linhagens celulares cultivadas *in vitro*.

OBJETIVOS

- Clonar e expressar o gene *ipaC* de *Shigella flexneri* 2a linhagem 2457T em *Lactococcus lactis* linhagem MG1363 utilizando os vetores constitutivos pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut;
- Clonar e expressar o gene *ipaC* de *Shigella flexneri* 2a linhagem 2457T em *Escherichia coli* linhagem BL21 (DE3), utilizando o vetor pET28a;
- Administrar os produtos das bactérias recombinantes via subcutânea em coelhos para a produção de anticorpos;
- Avaliar a capacidade desses anticorpos de bloquear a adesão e a invasão de *S. flexneri* em linhagens celulares cultivadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens bacterianas

Escherichia coli linhagem BL21 (DE3) gentilmente cedida pela Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (Departamento de Biologia Vegetal, Unicamp); *Escherichia coli* DH10 β gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Marcelo Brocchi (Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Unicamp); *Shigella flexneri* 2a linhagem 2457T gentilmente cedida pelo Dr. Antony Maurelli (Department of Microbiology and Immunology, Uniformed Services University of the Health Sciences) e a bactéria *Lactococcus lactis* linhagem MG1363 gentilmente cedida pela Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira (Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan).

Vetores plasmidiais

Para a realização dos experimentos envolvendo clonagem e expressão foram utilizados os vetores pET28a (Novagen), gentilmente cedido pela Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (Departamento de Biologia Vegetal, Unicamp); os vetores pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut, gentilmente cedidos pela Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira (Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan) e o vetor pIDTBlue (Integrated DNA Technologies). A seção Material e Métodos foi subdividida em dois blocos: os experimentos envolvendo o vetor pET28a em *E. coli* BL21 (DE3) e os experimentos envolvendo os vetores pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut em *L. lactis* linhagem MG1363.

Experimentos – vetor pET28a

Extração plasmidial em pequena escala

A extração plasmidial foi realizada com a utilização do kit QIAprep®Spin Miniprep (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Para a corrida eletroforética, 6 µl do material extraído foram misturados com 1 µl de tampão de ressuspensão de DNA, e a mistura aplicada em gel de agarose a 0,6%. O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas de DNA foram visualizadas através de um transiluminador de raios Ultra-Violeta (UV).

Extração de DNA por fervura

A bactéria *S. flexneri* 2a linhagem 2457T cresceu durante 18 horas em meio LB sem antibiótico. Após o crescimento, transferiram-se 500 µL da cultura bacteriana para um tubo que foi submetido a uma centrifugação de 12000 rpm por 2 minutos. O precipitado resultado da centrifugação foi ressuspensionado em 500 µL de água deionizada autoclavada e em seguida centrifugou-se esse material novamente. Esse procedimento foi realizado mais uma vez e, ao final, ressuspendeu-se o precipitado em 500 µL e o tubo foi submerso em água fervendo por 10 minutos. Após a fervura, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo e guardado a -20°C.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene *ipaC*

O DNA obtido por fervura, conforme descrito no item anterior, foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene *ipaC* (1092 pb). Os iniciadores,

as enzimas (FastDigest, Fermentas) de restrição e as condições de reação utilizadas encontram-se na Tabela 1. Para o desenho dos iniciadores foi utilizado o programa Gene Runner 3.05 e a sequência do gene foi retirada do *Shi*BASE (integrated database for comparative genomics of *Shigella*) a partir da sequência de *Shigella flexneri* sorotipo 2a linhagem 301 (Plasmídio de Virulência pCP301).

Tabela 1. Iniciadores, enzimas e condições de reação utilizados para a amplificação do gene *ipaC*.

Nome	Enzima de Restrição	Sequência do Iniciador (5'→3')
ipaCF	<i>Bam</i> HI	TGCTGCGGATCCATGGAAATTCAAAC
ipaCR	<i>Hind</i> III	TGCTGCAAGCTTTTAAGCTCGAATGTT

A reação iniciou-se a partir de um processo de denaturação de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto; uma etapa de anelamento de 57°C por 1 minuto e uma extensão a 72 °C por 2 minutos. O protocolo foi concluído por um período de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR obtidos foram purificados com a utilização do kit PureLink™ (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

Digestão dos produtos de PCR e do vetor de expressão

Após a purificação, os produtos de PCR e o vetor pET28a foram submetidos às reações de digestão. Os reagentes utilizados e as condições de reação estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Reagentes e condições de reação utilizadas para a digestão do gene *ipaC* e do vetor pET28a.

Reagentes	Volume
Água esterilizada deionizada	22 µL
DNA	20 µL
Tampão 10x	5 µL
<i>Bam</i> HI	1,5 µL
<i>Hind</i> III	1,5 µL

A reação foi realizada por 1 hora a 37°C. Um microlitro de enzima é capaz de digerir cerca de 1 µg de DNA genômico em 5 minutos ou 5 µg de DNA genômico em 30 minutos.

Como descrito no item anterior, os produtos das reações de digestão foram purificados com o kit PureLink™ (Invitrogen).

Ligação do gene *ipaC* ao vetor pET28a

Os produtos de PCR e os plamídios previamente submetidos à digestão foram ligados de acordo com as especificações listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Reagentes e condições de reação utilizados para a ligação do gene *ipaC*.

Reagentes	Volume/Concentração
Água esterilizada deionizada	7 µL
Gene <i>ipaC</i>	5 µL (250 ng)
Plasmídio	5 µL (50 ng)
Tampão 10x	2 µL
T4 DNA Ligase	1 µL

A reação foi realizada por 18 horas a 16°C.

Os produtos das reações de ligação foram purificados com a utilização do kit PureLink™ (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

Preparo da linhagem de *Escherichia coli* BL21 (DE3) quimiocompetente

Uma colônia da linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) foi inoculada em 4 mL de meio Luria-Bertani (LB) e incubada a 37°C por aproximadamente 18 horas. Em seguida, 500 µL do cultivo bacteriano foram transferidos para 50 mL de meio LB para crescimento a 37°C, até atingir a densidade óptica de 0,6 a 600 nm. Atingida a densidade ideal, o crescimento bacteriano foi transferido para tubos esterilizados previamente resfriados. Após 10 minutos de centrifugação a 4000 rpm em uma temperatura de 4°C, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células com 10 mL de cloreto de cálcio a 100 mM. Esse processo de centrifugação e descarte foi realizado por mais duas vezes. Na terceira vez juntaram-se os conteúdos dos tubos em apenas um para realizar a última centrifugação. Depois de descartado o sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 600 µL de cloreto de cálcio e esse volume dividido em alíquotas de 100 µL. As células quimiocompetentes de BL21

(DE3) foram, assim, deixadas no gelo e na geladeira por até 18 horas para então serem utilizadas.

Transformação de *Escherichia coli* BL21 (DE3) quimiocompetente

Adicionaram-se 10 µL da reação de ligação (pET28a/*ipaC*) ao volume de 100 µL de células quimiocompetentes e os tubos foram deixados no gelo por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram transferidos do gelo para o banho a 42°C onde permaneceram por 90 segundos e, em seguida, mantidos no gelo por 2 minutos. Passado esse tempo, adicionaram-se 900 µL de meio LB em cada tubo e estes foram incubados na estufa em banho-maria a 37°C por 2 horas. Depois das 2 horas sob crescimento na estufa, as bactérias foram espalhadas nas placas de Lúria-Bertani Ágar (LA) com Kanamicina a 30 µg/mL.

Sequenciamento dos clones positivos

Os clones positivos foram sequenciados com a utilização dos iniciadores T7 Forward e T7 Terminator específicos para o vetor pET28a. As condições de reação encontram-se no quadro IV. Para as reações foi utilizado o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing. O sequenciador utilizado foi o MegaBACE™ DNA Analysis Systems (Amersham Bioscience). A seqüência FASTA gerada foi comparada às seqüências já depositadas no Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI) para a identificação dos genes em questão.

Indução da expressão da proteína IpaC

Cinco mililitros de uma cultura de *E. coli* BL21 (DE3) crescida por aproximadamente 18 horas foram inoculados em 1 L de meio LB e mantidas a 37°C sob agitação (220 rpm)

até atingir a DO_{600nm} entre 0,35 e 0,45. A seguir, a cultura bacteriana foi induzida com 1 mM de IPTG por 4 horas a 37°C na mesma agitação inicial.

Extração da proteína IpaC

Os precipitados coletados a partir da indução foram ressuspensos em 20 mL de tampão de extração composto por: 20 mM de Tris-HCl pH 7,5; 500 mM de NaCl (o pH do tampão foi determinado de acordo com o valor teórico do ponto isoelétrico da proteína obtido através do site: <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). A esta solução foi adicionada lisozima para uma concentração final de 1 mg/mL, 1 mM de PMSF e 1% de Triton X-100. As células foram incubadas no gelo por 30 minutos. Após esse tempo, as células foram sonicadas em 7 ciclos de 20 segundos cada com a utilização de um homogeneizador ultrassônico modelo 4710 (Cole-Parmer Instrument Co), centrifugadas a 13500 rpm por 30 minutos e o sobrenadante estocado a -20°C para testes posteriores.

Gel SDS-PAGE para verificação da expressão da proteína IpaC

Para verificação da expressão protéica, um volume de 10 µl de cada amostra obtida a partir da extração foram analisados através de eletroforese vertical em gel SDS-PAGE a 12% (Sambrook *et al.*, 1989). Antes de serem aplicadas, as amostras foram fervidas por 5 minutos. Os reagentes utilizados na preparação do gel estão listados na tabela 4. Para a corrida eletroforética utilizou-se o tampão Tris-Glicina composto por 25 mM de Tris, 250 mM de Glicina e 0,1% de SDS.

Tabela 4. Reagentes utilizados para a preparação do gel SDS-PAGE 12% (Sambrook *et al.*, 1989).

Gel de Separação 12%	5 mL
Água deionizada	1,6 mL
Acrilamida mix 30%	2 mL
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	1,3 mL
SDS 10%	0,05 mL
Persulfato de Amônio 10%	0,05 mL
TEMED	0,002 mL

Gel de Empacotamento 5%	2 mL
Água deionizada	1,4 mL
Acrilamida mix 30%	0,33 mL
Tris-HCl 1 M (pH 6,8)	0,25 mL
SDS 10%	0,02 mL
Persulfato de Amônio 10%	0,02 mL
TEMED	0,002 mL

Purificação por cromatografia de afinidade

A purificação da proteína IpaC foi realizada através de cromatografia de afinidade devido aos 6 resíduos de histidina adicionados à porção N-terminal do gene *ipaC*. Antes de iniciar o processo de purificação, 1 mL da resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen) foi adicionado a uma coluna 1x10 cm (Bio-Rad Econo column, Bio-Rad), lavada com água deionizada e equilibrada com tampão de extração (20 mM de Tris-HCl pH 7,5; 500 mM de NaCl). Terminada a preparação, os 20 mL de sobrenadante resultantes da extração da proteína IpaC foram adicionados à coluna contendo a resina para imobilização da proteína à resina. Após o processo de interação proteína-resina, foi realizada a eluição da proteína através de lavagens da resina com tampão de extração contendo concentrações crescentes de imidazol (5 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM). Aliquotas de 10 µL das diversas frações foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12% para se verificar em qual

delas a proteína IpaC estaria presente. A concentração protéica foi determinada com a utilização do reagente de Bradford.

Espectrometria de massa

A identidade da proteína IpaC foi confirmada empregando-se a técnica de espectrometria de massa. Resumidamente, a análise por espectrometria de massa foi realizada removendo-se a banda protéica do gel de SDS-PAGE, seguida por sua digestão proteolítica utilizando tripsina (Promega). A separação dos peptídeos, gerados pela digestão foi realizada por cromatografia de troca reversa e a ionização feita em nanoelectrospray. A obtenção de informações sequenciais por espectrometria de massas em tandem (MS-MS) foi feita no equipamento LT-Orbitrap-XL (Thermo Scientific) utilizando alta resolução para a aquisição dos fragmentos precursores (Orbitrap) e ion trap linear para obtenção de MS². Os resultados foram analisados confrontando-se a sequência dos peptídeos obtidos com aquelas já depositadas no Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI).

Produção de anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais para a proteína IpaC foram produzidos em coelhos machos da raça Nova Zelândia brancos com aproximadamente 2 Kg de peso. Foram utilizados três animais, sendo que dois receberam a proteína e um serviu de controle, recebendo apenas PBS. Para a inoculação, a banda correspondente à proteína IpaC, expressa no vetor pET28a, foi recortada diretamente do gel de acrilamida e congelada. Após o congelamento, a banda foi macerada em 500 µL de PBS até que a solução ficasse com aspecto homogêneo. Assim, adicionaram-se à solução 500 µL de adjuvante de Freund e agitou-se

até a formação de emulsão homogênea. A inoculação ocorreu por via subcutânea e o protocolo de imunização está descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Protocolo para produção de anticorpos policlonais anti-IpaC.

Dia	Dose	Concentração	Adjuvante de Freund
1° Dia	1ª	216 µg	Completo
15° Dia	2ª	270 µg	Incompleto
30° Dia	3ª	319 µg	Incompleto
45° Dia	Dose Reforço	319 µg	Incompleto
50° Dia	Sacrifício Animal	-	-

Finalizadas as inoculações, acima descritas, foram coletados 50 mL de sangue através de punção cardíaca para a obtenção do soro policlonal.

Teste de ELISA para a quantificação dos anticorpos

Antes de iniciar o procedimento, a proteína (que foi dialisada em tampão PBS com 300mM de NaCl) foi diluída em tampão carbonato de sódio 0,2M pH 9,6 e incubada por 4 horas a 37°C. Uma placa de ELISA de alta capacidade foi sensibilizada com 100 µl/poço de antígeno (frações purificadas da proteína IpaC), em triplicatas. Em uma placa utilizou-se o antígeno diluído 25X e na outra, o antígeno foi diluído 50X. As placas foram, então, bloqueadas com uma solução de PBS 0,2M + 2% de leite em pó desnatado (200 µL/poço) na qual permaneceram por 1 hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T (PBS com 0,05% Tween), sendo que em cada poço foram aplicados 200 µL de solução em cada lavagem. Por último, aplicaram-se 100 µL dos soros policlonais previamente diluídos em PBS. As diluições testadas foram 1:250; 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000 e 1:16000. Como controle negativo foi utilizada apenas a solução PBS. As placas foram, assim, incubadas a 4°C por 16 horas. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS Tween, (200 µL/poço). Aplicaram-se, em

seguida, 100 μ L/poço do anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, diluído 1:20000 em PBS. Nesta etapa, o período de incubação foi de 1 hora a 37°C. Novamente, as placas foram lavadas com PBS Tween. Após a lavagem, em cada poço foram adicionados 100 μ L do tampão substrato dietanolamina contendo 1 mg/mL de pNPP (p-nitrofenil fosfato). Incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente, no escuro e, finalmente, a leitura das placas foi efetuada no espectrofotômetro a 405 nm.

“Western blot” para a confirmação da produção dos anticorpos

A análise de expressão da proteína IpaC, nos diferentes vetores em bactérias lácticas, foi realizado por “western blot”, no qual as frações protéicas separadas por SDS-PAGE foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon, Millipore™). A transferência ocorreu a 350mA e 25V por 30 minutos à temperatura ambiente, em um sistema semi-seco (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) contendo tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM de Glicina, 0,1 % de SDS e 20 % de Metanol). As interações inespecíficas foram bloqueadas por 18 horas com solução TBS-T (TBS e 0,1% de Tween 20) e leite em pó desnatado a 5%. A membrana contendo as proteínas transferidas foi lavada por três vezes, durante 5 minutos, sob agitação com TBS-T. Em seguida, a membrana foi colocada em contato com o soro de coelho contendo anticorpo policlonal anti-IpaC diluído 1:10000 em solução de TBS-Tween-leite, por 4 horas. Terminado esse período, repetiu-se o processo de lavagem descrito acima, sendo a membrana incubada com soro anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (RheaBiotech), na diluição 1:10000, por 2 horas. A membrana foi, novamente, lavada com TBS-T por três vezes de 5 minutos cada. Descartou-se o tampão e adicionou-se tampão de

equilíbrio (100 mM de Tris-HCl pH 9,0, 100 mM de NaCl e 1 mM de MgCl₂). Após 15 minutos, a reação foi revelada utilizando-se 20 mL da mesma solução base de Tris-HCl contendo 33 µL de NBT e 16,5 µL de BCIP (os reagentes devem ser adicionados nesta ordem para que não ocorra precipitação de um deles). Foi realizado, também, um segundo método de revelação para o “western blot” a fim de se intensificar a visualização das bandas caso a expressão protéica fosse baixa. Nesse método, foi utilizado o luminol (“western blot” Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology) como revelador e um transluminador especial para a detecção das amostras protéicas na membrana. Uma outra metodologia foi realizada em relação ao tempo de bloqueio e de exposição da membrana ao anticorpo primário. Em praticamente todos os testes a membrana permaneceu na solução de bloqueio por 18 horas e por cerca de 4 horas no anticorpo primário. Em um único teste, a membrana permaneceu em exposição ao anticorpo primário por 18 horas.

Teste de sensibilidade à gentamicina

Foi realizado um teste de sensibilidade da bactéria *S. flexneri* 2a linhagem 2457T ao antimicrobiano gentamicina para a determinação da concentração utilizada no teste de invasão (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010).

Cultivo de células HeLa para o teste de invasão

Para o cultivo das células HeLa foi utilizado o meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Nutricell). A cada dois dias as células eram lavadas três vezes com PBS 1x (Tampão Fosfato Salina) a 37°C e o meio DMEM substituído por um novo. Assim que a garrafa de 75 cm³ atingiu uma confluência de 90%, foram adicionados 2 ml de tripsina (Nutricell) e a mesma permaneceu por 5 minutos à temperatura ambiente, para que

as células HeLa se desprendessem da superfície à qual estavam aderidas. As células foram, a seguir, homogeneizadas, divididas em 3 reservatórios iguais ao original (no caso de replicação celular), ou passadas para placas de cultura celular (para testes *in vitro*), sendo nesse caso, distribuído 1 ml para cada poço.

Teste de invasão

Para testes qualitativos e quantitativos, a bactéria *Shigella flexneri* 2a linhagem 2457T foi avaliada quanto a sua capacidade de invadir células HeLa, na presença e ausência de anticorpos produzidos, conforme descrito anteriormente. Para a realização deste teste, células HeLa foram previamente cultivadas (em triplicatas) em placas de 24 poços em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Nutricell) com antibiótico por 18 horas a 37°C. Verificado o crescimento, descartou-se o meio de cultura das células e lavou-se cada poço com 1 mL de PBS por três vezes. Após as lavagens, adicionaram-se 990 µL de meio DMEM sem antimicrobiano e 10 µL de cultura bacteriana (*Shigella flexneri* 2a 2457T) previamente crescida durante 18 horas. As células HeLa e as células bacterianas permaneceram em contato durante 90 minutos a 37°C na presença de 5% de CO₂. Nesse momento, adicionou-se o anticorpo produzido para reconhecer a proteína IpaC nas seguintes diluições: 1:125, 1:250, 1:1000 e 1:4000. Para cada diluição, as bactérias permaneceram em contato com os anticorpos por 90 minutos, 60 minutos, 30 minutos e 15 minutos. Passado esse período, adicionou-se gentamicina (50 µg/mL) e a mistura incubada nas condições acima descritas por mais 1 hora e 30 minutos. O conteúdo de cada poço foi, então, descartado e as células mais uma vez lavadas com PBS. Terminada essa etapa, foi acrescentado meio DMEM e as amostras incubadas por mais 3 horas. Realizaram-se mais três lavagens com PBS e, em seguida, as células foram incubadas por 15 minutos com

PBS/Triton 1% à temperatura ambiente. Para a verificação do processo invasivo realizou-se uma diluição seriada das suspensões contendo bactérias e células lisadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) em PBS e 50 μ L de cada diluição (esse processo foi realizado para todos os tempos descritos acima) foram colocados sobre placas contendo meio LA. Da mesma forma, plaquearam-se 50 μ L da suspensão sem diluição. Depois do crescimento, foi feita a contagem das bactérias invasivas em unidades formadoras de colônia por mililitro (CFU/mL).

Experimentos – vetores pT1NX, pT1NXMut e pT1NXssAnch

Extração plasmidial em pequena escala

A extração plasmidial foi realizada com a utilização do kit QIAprep®Spin Miniprep (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Para a corrida eletroforética, 6 μ l do material extraído foram misturados com 1 μ l de tampão de ressuspensão de DNA, e a mistura aplicada em gel de agarose a 0,6%. O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas de DNA visualizadas através de um transiluminador de raios Ultra-Violeta.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene *ipaC*

O DNA obtido por fervura, conforme descrito anteriormente, foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene *ipaC* (1092 pb). Os iniciadores, as enzimas de restrição (FastDigest, Fermentas) e as condições de reação utilizadas encontram-se na Tabela 6. Para o desenho dos iniciadores foi utilizado o programa Gene Runner 3.05 e a sequência do gene foi retirada do *Shi*BASE (integrated database for

comparative genomics of *Shigella*) a partir da sequência de *Shigella flexneri* sorotipo 2a linhagem 301 (Plasmídio de Virulência pCP301).

Tabela 6. Iniciadores, enzimas e condições de reação utilizados para a amplificação do gene *ipaC*.

Vetor	Nome	Enzima de Restrição	Sequência do Iniciador (5'→3')
pTINX	ipaCFSec	<i>Ngo</i> MIV	AGTAGTGCCGGCATGGAAATTCAAAACACA
	ipaCRpTINX	<i>Bam</i> HI	AGTAGTGGATCCTTAAGCTCGAATGTTACC
pTINXssAnch	ipaCFSec	<i>Ngo</i> MIV	AGTAGTGCCGGCATGGAAATTCAAAACACA
	ipaCRAnch	<i>Bam</i> HI	AGTTGCGGATCCAGCTCGAATGTTACCAGC
pTINXMut	ipaCFCit	<i>Eco</i> RV	AGTTGCGATATCATGGAAATTCAAAACACA
	ipaCRpTINX	<i>Bam</i> HI	AGTAGTGGATCCTTAAGCTCGAATGTTACC

A reação iniciou-se a partir de um processo de denaturação de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto; uma etapa de anelamento de 57°C por 1 minuto e uma extensão a 72 °C por 2 minutos. O protocolo foi concluído por um período de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR obtidos foram purificados com a utilização do kit PureLink™ (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

Digestão dos produtos de PCR e do vetor de expressão

Após a purificação, os produtos de PCR e os vetores pTINX, pTINXssAnch e pTINXMut foram submetidos às reações de digestão. Os reagentes utilizados e as condições de reação estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Reagentes e condições de reação utilizadas para a digestão do gene *ipaC* e dos vetores pTINX, pTINXssAnch e pTINXMut.

Reagentes	Volume
Água esterilizada deionizada	22 µL
DNA	20 µL
Tampão 10x	5 µL
Enzima 1*	1,5 µL
Enzima 2*	1,5 µL

*Para os vetores pTINX e pTINXssAnch - Enzima 1: *Ngo*MIV e Enzima 2: *Bam*HI

*Para o vetor pTINXMut - Enzima 1: *Eco*RV e Enzima 2: *Bam*HI

A reação foi realizada por 1 hora a 37°C. Um microlitro de enzima é capaz de digerir cerca de 1 µg de DNA genômico em 5 minutos ou 5 µg de DNA genômico em 30 minutos.

Como descrito no item anterior, os produtos das reações de digestão foram purificados com o kit PureLink™ (Invitrogen).

Ligação do gene *ipaC* aos vetores pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut

Os produtos de PCR e os plamídios previamente submetidos à digestão foram ligados de acordo com as especificações listadas na Tabela 8.

Tabela 8. Reagentes e condições de reação utilizados para a ligação do gene *ipaC* com os vetores pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut.

Reagentes	Volume/Concentração
Água esterilizada deionizada	7 μ L
Gene <i>ipaC</i>	5 μ L (250 ng)
Plasmídio	5 μ L (50 ng)
Tampão 10x	2 μ L
T4 DNA Ligase	1 μ L

A reação foi realizada por 18 horas a 16°C.

Os produtos das reações de ligação foram purificados com a utilização do kit PureLink™ (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

Preparo da linhagem de *Lactococcus lactis* MG1363 eletrocompetente

A partir de uma cultura crescida por aproximadamente 18 horas, foi preparada uma diluição de 1:25 do cultivo, em meio GM17 (meio M17 acrescido de 0,5% de glicose) com 0,5M de sacarose e 1% de glicina. A cultura foi mantida a 30°C até atingir a densidade óptica entre 0,5 e 0,7 a 600 nm. As células foram, então, coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos e o precipitado lavado duas vezes com tampão de eletroporação (0,5M de sacarose e 1% de glicerol) e ressuspenso em um volume equivalente a 1:100 do volume original da cultura. As células eletrocompetentes foram divididas em alíquotas de 100 μ L e congeladas a -80°C.

Eletroporação de *Lactococcus lactis* linhagem MG1363

Para a eletroporação, uma das alíquotas de bactérias eletrocompetentes foi misturada a aproximadamente 10 μ L dos produtos das reações de ligação (pT1NX/*ipaC*;

pT1NXssAnch/*ipaC* e pT1NXMut/*ipaC*. A eletroporação foi realizada em cubetas Gene Pulser® (Bio-Rad) de 0,2 cm a 2500 V, 200 Ohm e 25 F. Após o choque as bactérias foram suspensas em 5 mL de meio GM17 com 0,5 M de sacarose, 20 mM de MgCl₂, 1 mM de CaCl₂ e incubadas a 30 °C por 2 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas e suspensas em 500 µL do mesmo meio. O volume total foi dividido em três placas de GM17 contendo 0,5 M de sacarose e 5 µg/mL de eritromicina. As colônias recombinantes apareceram em aproximadamente dois dias. Os clones foram analisados através de PCR de colônia, e aqueles que apresentaram amplificação dos fragmentos considerados foram estocados a -80°C.

Sequenciamento dos clones positivos

O seqüenciamento das construções em pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut foram realizados utilizando-se os iniciadores específicos para o gene *ipaC*. Para a realização do procedimento foi utilizado o kit “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystem) como agente fluorescente. Após a reação de PCR de seqüenciamento, as amostras foram submetidas ao seqüenciamento automático de DNA utilizando o aparelho ABI 3700 DNA Analyzer-Applied Biosystems. As seqüências obtidas foram analisadas pelo “Sequencing Analysis 3.4” e a montagem da seqüência, verificação da qualidade das bases dos eletroferogramas e arquivos gerados no formato FASTA realizados pelo pacote de programas “Phred/Phrap/Consed” (Ewing *et al.*, 1998; Ewing e Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998). A seqüência FASTA gerada foi comparada com as seqüências já depositadas no Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI) para a identificação dos genes em questão.

Indução da expressão da proteína IpaC

Duzentos microlitros de uma cultura de *L. lactis* MG1363 crescida por aproximadamente 18 horas foram inoculados em 20 mL de meio GM17 que foi mantido a 30°C sem agitação. Como esses vetores são constitutivos não houve indução. A única condição considerada para se verificar diferenças na taxa de expressão foi a fase de crescimento bacteriano. Dessa forma, foram utilizados 20 mL para cada condição de crescimento: fase logarítmica, crescimento por aproximadamente 10 horas e crescimento por 18 horas. Nesses dois últimos períodos, as culturas bacterianas atingiram a fase estacionária de crescimento. Atingidas as condições, o crescimento bacteriano contendo as construções pT1NXssAnch/*ipaC*, pT1NXMut/*ipaC* foi coletado por centrifugação a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C. Para a construção com o vetor pT1NX/*ipaC*, que deve secretar a proteína para meio extracelular, realizou-se a etapa de centrifugação coletando-se apenas o sobrenadante que foi guardado para ser aplicado diretamente no gel.

Extração da proteína IpaC

Para os vetores de *L. lactis* a extração protéica foi realizada com 5 mL de tampão de extração composto por: 20 mM de Tris-HCl pH 7,5; 500 mM de NaCl, 20 mg/mL de lisozima e 1 mM de PMSF. As culturas bacterianas foram incubadas com este tampão por aproximadamente 2 horas a 37°C para a otimização da ação da lisozima sobre a parede celular das bactérias Gram-positivas. Após esse processo, as células foram, ainda, sonicadas em 10 ciclos de 20 segundos cada com a utilização de um homogeneizador ultrassônico modelo 4710 (Cole-Parmer Instrument Co). Apenas a amostra contendo a construção com o vetor que expressa a proteína no citoplasma (pT1NXMut) foi centrifugada a 13500 rpm por 30 minutos e o sobrenadante guardado a -20°C. A amostra

contendo o vetor pT1NXssAnch passou pelos processos acima descritos, sendo omitida a etapa de centrifugação.

Gel SDS-PAGE para verificação da expressão da proteína IpaC

Para verificação da expressão protéica um volume de 10 ul de cada amostra obtidas a partir da extração foram analisados através de eletroforese vertical em gel SDS-PAGE a 12% (Sambrook *et al.*, 1989). Antes de serem aplicadas, as amostras foram fervidas por 5 minutos.

Coloração de prata do gel SDS-PAGE para verificação da expressão da proteína IpaC

Após a corrida, o gel contendo a proteína IpaC foi submetido à coloração de prata. Para isso, o gel permaneceu por 2 horas em uma solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 12% e 150 µL/mL de formaldeído). Após essa primeira etapa, o gel foi lavado por 3 vezes de 20 minutos cada em etanol 50%. Depois das lavagens, foi deixado por 1 minuto em tiosulfato de sódio (0,06 g para 300 mL de água). A seguir, lavou-se o gel por 3 vezes de 20 segundos em água para que se iniciasse o processo de coloração com a seguinte solução: 0,6 g de nitrato de prata e 225 µL de formaldeído para um volume final de 400 mL. Nesta solução, o gel permaneceu imerso por 20 minutos. Terminada a etapa de coloração, o gel foi lavado novamente por 3 vezes de 20 segundos cada e, então, aplicou-se a solução de revelação com a seguinte composição: 24 g de carbonato de sódio, 200 µL de formaldeído e 16 mL da solução de tiosulfato de sódio (utilizada no início do experimento). Essas quantidades de reagentes foram utilizadas para um volume final de 400 mL de solução de revelação, que permaneceu em contato com o gel até que as bandas correspondentes às proteínas ficassem visíveis. Nesse momento, aplicou-se ao gel uma solução de ácido

acético 5% para que o processo de revelação fosse interrompido e também para a fixação do nitrato de prata.

Ensaio de imunoafinidade

Para melhor visualização da proteína IpaC, na técnica de “western blot”, foi realizado o ensaio de imunoafinidade para *L. lactis*. Este teste consiste em carregar uma resina (CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare) com os anticorpos desejados. Neste caso, utilizaram-se anticorpos anti-IpaC para que se pudesse purificar os extratos protéicos obtidos a partir de *L. lactis* recombinantes expressando a proteína IpaC. Para a realização da imunoafinidade, foram utilizadas duas resinas que foram preparadas de acordo com as especificações do fabricante. Na primeira foram purificados os controles negativo e positivo, respectivamente, e na segunda foram purificadas as amostras dos vetores pT1NX, pT1NXMut e pT1NXssAnch, respectivamente. Em primeiro lugar, para cada resina adicionou-se um volume de 20 mL de água deionizada autoclavada e, posteriormente, mais 20 mL do tampão de extração de IpaC (20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 500 mM de NaCl e 1 mM de PMSF) para equilibrar a resina. Em seguida, foi adicionada a primeira amostra (controle negativo – vetor pT1NX sem o gene *ipaC* - em uma coluna e pT1NX/*ipaC* em outra) e, esgotando-se o volume de amostra, adicionados 2 mL de tampão de eluição (Glicina 100 mM pH 3,4). Como as frações protéicas eram eluídas com um tampão ácido, adicionou-se um volume de 10% de tampão Tris-HCl 1 M pH 9,0 (do volume total) às amostras coletadas. Após a coleta da amostra, adicionou-se Tris-HCl 50 mM pH 8,0 a fim de se restaurar o pH da resina. O último passo foi, novamente, adicionar água à resina e, para seguir com a próxima amostra, após a água reiniciou-se com a adição do tampão de extração. Uma vez purificadas, 10 µL de cada fração protéica coletada foram analisados

através de eletroforese vertical em gel SDS-PAGE a 12% (Sambrook *et al.*, 1989) e o mesmo gel utilizado para a realização do “western blot”.

Extração de RNA total

A extração de RNA total de *L. lactis* recombinantes foi realizada com a utilização do kit RNeasy Mini (Qiagen) de acordo com as especificações do fabricante.

PCR em tempo real

Foram realizadas reações em cadeia da polimerase em tempo real com a utilização do kit SensiMix SYBR One-step (Invitrogen) para a quantificação da expressão protéica. Os iniciadores foram desenhados a partir da sequência do gene retirada do *Shi*BASE (integrated database for comparative genomics of *Shigella*) com base na sequência de *Shigella flexneri* sorotipo 2a linhagem 301 (Plasmídio de Virulência pCP301). Os iniciadores para o gene *ipaC* foram desenhados a partir da sequência otimizada (Tabela 9). O desenho dos iniciadores para o gene normalizador (controle endógeno) foi realizado a partir da sequência do gene *rpoA* de *L. lactis* linhagem MG1363 e estão listados na Tabela 10. Todos os iniciadores utilizados foram gerados pelo programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). As reações foram realizadas no aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Após a realização das reações para padronização definiu-se o uso de 0,1 ng/ μ L de RNA total e o uso de 0,2 pmol de cada iniciador.

Tabela 9. Iniciadores e condições de reação utilizados para a quantificação da transcrição do gene *ipaC*.

Nome	Sequência do Iniciador (5'→3')
ipaCFpBLUE	AGTGCTCTTCGTACGGCTGAA
ipaCRpBLUE	TGTTGCATCAAAAGCGATTAAACT

A reação iniciou-se com uma temperatura de 48°C por 10 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Tabela 10. Iniciadores e condições de reação utilizados para a amplificação do gene normalizador (*rpoA*).

Nome	Sequência do Iniciador (5'→3')
rpoAFLL	TTCAACACGAATTCGCAACAA
rpoARLL	CGCAAGAACGATTTGGATGA

A reação iniciou-se com uma temperatura de 48°C por 10 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Imunocitoquímica

As bactérias recombinantes carregando os vetores de expressão pT1NXssAnch, pT1NXMut e pET28a foram submetidas à técnica de imunocitoquímica para se verificar a presença da proteína IpaC diretamente na célula bacteriana. Para isso, 100 µL de cada cultura bacteriana crescida durante 18 horas, foram diluídos em 900 µL de meio GM17 (para as bactérias lácticas) e LB (para *E. coli*). Duzentos microlitros de cada amostra diluída foram centrifugados em uma centrífuga própria para a fixação de células para que as bactérias fossem fixadas às lâminas de vidro. As amostras carregando os vetores de expressão pT1NXMut e pET28a foram previamente tratadas com uma solução de PBS contendo 5 mg/mL e 20 µg/mL de lisozima, respectivamente, a fim de se permeabilizar os envoltórios celulares para a entrada dos anticorpos e para o reconhecimento da proteína que, para esses vetores, é expressa no citoplasma bacteriano. Não foi necessária a realização desse procedimento para as amostras que carregavam o vetor pT1NXssAnch uma vez que, no caso deste vetor especificamente, a proteína deve apresentar-se ancorada à parede celular da bactéria. Depois do processo de digestão, seguiu-se com o protocolo de imunocitoquímica de acordo com as especificações do kit ImmunoCruz™ rabbit ABC Staining System sc-2018 (Santa Cruz Biotechnology). O anticorpo primário anti-IpaC foi utilizado na diluição de 1:50. A determinação do uso dessa diluição específica foi baseada em testes preliminares com diferentes diluições tendo esta apresentado o melhor resultado

na detecção da proteína. Para a visualização das bactérias, as amostras foram contra-coradas com o corante violeta genciana.

Experimentos – vetor pIDTBlue

O vetor pIDTBlue, contendo a sequência otimizada do gene *ipaC*, inicialmente liofilizado, foi ressuspensão em 20 µL de água deionizada autoclavada, em concentração final de 0,1 µg/µL. Essa amostra de 0,1 µg/µL foi em seguida diluída para uma concentração de 5 ng que foi utilizada para a transformação na bactéria *E. coli* DH10β (preparada de acordo como descrito para a bactéria *E. coli* BL21). Os clones resistentes à ampicilina foram confirmados como positivos através de PCR (para o gene *ipaC*). Estes mesmos clones também tiveram seu DNA plasmidial extraído (QIAprep®Spin Miniprep, Qiagen) e digerido com as enzimas de restrição específicas para a confirmação da presença do gene *ipaC*. Após a digestão, purificaram-se as bandas resultantes que correspondiam ao gene *ipaC* a partir do gel de agarose a 1% com a utilização do kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen). O gene *ipaC* purificado do vetor pIDTBLUE foi, então, subclonado nos vetores pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut, previamente digeridos com as enzimas *NgoMIV/BamHI* (para pT1NX e pT1NXssAnch) e *EcoRV/BamHI* (para pT1NXMut). É importante destacar que, quando o gene *ipaC* foi sintetizado, em sua sequência já constava os sítios de restrição para subclonagem no vetor pT1NXMut. Neste caso específico não houve, portanto, a necessidade de amplificar o gene para a inserção das sequências de restrição. Para os outros dois vetores, as sequências de restrição foram inseridas através de PCR, sendo que o utilizou-se o vetor pIDTBLUE como “template” da reação. A Tabela 11 mostra os iniciadores, enzimas e condições de reação.

Tabela 11. Iniciadores, enzimas e condições de reação utilizados para a amplificação do gene *ipaC*.

Vetor	Nome	Enzima de Restrição	Sequência do Iniciador (5'→3')
pT1NX	ipaCFSEc-pBLUE	<i>Ngo</i> MIV	AGTAGTGCCGGCATGGAAATACAAAATACT
	ipaCRpT1NX-pBLUE	<i>Bam</i> HI	AGTAGTGGATCCTTAAGCTCTAATATTGCC
pT1NXssAnch	ipaCFSEc-pBLUE	<i>Ngo</i> MIV	AGTAGTGCCGGCATGGAAATACAAAATACT
	ipaCRAnch-pBLUE	<i>Bam</i> HI	AGTTGCGGATCCAGCTCTAATATTGCCGGC

A reação iniciou-se a partir de um processo de denaturação de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto; uma etapa de anelamento de 57°C por 1 minuto e uma extensão a 72 °C por 2 minutos. O protocolo foi concluído por um período de extensão final de 10 minutos a 72°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias do gênero *Shigella* são patógenos entéricos de impacto global para a saúde que causam uma forma grave de disenteria chamada shigelose. A doença ocorre predominantemente nos países em desenvolvimento sendo que a maior parte dos casos relatados são de crianças menores de 5 anos de idade (Kotloff *et al.*, 1999). Além do alto índice de morbi-mortalidade, é importante destacar a questão do aumento no espectro de resistência dessas bactérias aos antimicrobianos, o que dificulta o tratamento dos doentes. Frente a isso, a Organização Mundial de Saúde têm priorizado o desenvolvimento de vacinas contra as diferentes espécies de *Shigella*. Sabe-se, no entanto, que seria muito difícil desenvolver uma vacina que oferecesse proteção contra as quatro espécies da bactéria ao mesmo tempo (Formal *et al.*, 1991). Dessa forma, uma alternativa seria observar a ocorrência de cada espécie em diferentes regiões, considerando, a partir disso, as mais prevalentes. Trabalhos mostram que, nos países em desenvolvimento, a maior prevalência é de *Shigella flexneri* (60%), enquanto que, nos países desenvolvidos, a prevalência é de *Shigella sonnei* (77%). Tanto em países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento, o sorotipo predominante de *Shigella flexneri* é o 2a.

Apesar da diferença na prevalência de cada espécie, de acordo com a região considerada, os mecanismos de patogenicidade descritos para as diferentes espécies de *Shigella* são praticamente os mesmos. Sabe-se que o sistema de secreção tipo III é essencial para a interação de muitas bactérias Gram-negativas, como *Shigella flexneri*, com células eucarióticas. As proteínas translocadas pelo sistema de secreção tipo III, que são codificadas em um plasmídio de 220 kb, são essenciais para o processo invasivo e para a manipulação das células hospedeiras pelas bactérias. Dentre todas as proteínas codificadas nesse plasmídio, destacam-se os antígenos plasmidiais de invasão B e C (IpaB e IpaC), os

quais participam dos passos iniciais no processo de invasão das células intestinais. Diversos trabalhos mostram que IpaB e IpaC são as primeiras proteínas a serem secretadas pelo sistema de secreção tipo III logo após o contato da bactéria com a célula hospedeira (Menard *et al.*, 1994a).

A partir do entendimento de parte dos mecanismos de patogenicidade e da ampliação no espectro de resistência a antimicrobianos, se faz necessária a busca de alternativas para o combate à infecção causada por *Shigella*. Como dito anteriormente, existe a necessidade de se desenvolver uma vacina que seja segura e efetiva contra a bactéria. Para isso, estão em estudo, tanto as desenvolvidas a partir de bactérias vivas atenuadas, como aquelas que utilizam bactérias não patogênicas que seriam carreadoras de subunidades protéicas de bactérias patogênicas. Nesse sentido, decidimos trabalhar com a proteína IpaC e com a bactéria láctica *Lactococcus lactis* no desenvolvimento de uma possível vacina contra *Shigella* e shigelose.

Para a expressão da proteína IpaC foram utilizados 3 vetores constitutivos: pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut (Schotte *et al.*, 2000). O primeiro vetor expressa a proteína e a secreta para o meio extracelular; o segundo a expressa ancorada à parede celular bacteriana e, no terceiro, a expressão é citoplasmática. A proteína IpaC também foi clonada no vetor pET28a na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) para se ter um controle da expressão e para a posterior produção de anticorpos anti-IpaC que seriam utilizados em testes imunológicos. Além disso, a partir da expressão nos diferentes sistemas foi possível a realização de um estudo comparativo entre a expressão nos vetores pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut próprios para expressão heteróloga em bactérias lácticas e a expressão no vetor pET28a em *E. coli* BL21(DE3) que constitui-se em um sistema muito conhecido e que promove a superexpressão de diversas proteínas.

A clonagem do gene *ipaC* foi verificada pela extração plasmidial das colônias obtidas após a transformação e posterior reação de PCR para a confirmação da presença do inserto dentro do vetor pET28a (Figura 3).

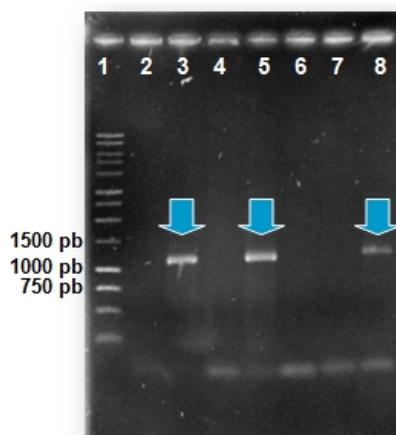


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Amplificação do gene *ipaC* a partir das colônias recombinantes resultantes da construção pET28a/*ipaC*. 1: Padrão de peso molecular (1Kb Ladder, Fermentas). 2: controle negativo. 3, 5 e 8: clones positivos.

Antes de se iniciar o processo de expressão protéica, os clones confirmados foram seqüenciados a fim de se verificar a integridade do gene e também para avaliar se a fase de leitura estava correta. Após a padronização das reações de sequenciamento, pôde-se confirmar que apenas um dos clones poderia ser utilizado para os testes posteriores por apresentar as características desejadas.

Depois da escolha do clone a ser trabalhado, foi realizada a expressão protéica. Para isso, utilizou-se o protocolo descrito por Picking *et al.* (1996), com algumas modificações, a fim de se facilitar o processo e de se obter uma maior quantidade de proteína mesmo após a purificação. Como descrito em trabalhos anteriores (High *et al.*, 1992; Menard *et al.*, 1993), é muito difícil produzir suspensões da proteína IpaC em virtude de sua instabilidade em solução. Esta característica deve-se a uma região hidrofóbica entre os aminoácidos 100 e 170 que, quando parcialmente exposta, é responsável pela inserção direta da proteína na

membrana plasmática (Tran *et al.*, 2000). Essa característica dificulta o processo de indução, de purificação, bem como a manutenção da proteína na forma solúvel.

Diversos estudos propõe diferentes metodologias para a otimização de sua produção na forma solúvel, no entanto, cada processo apresenta uma particularidade e a escolha deve ser feita de acordo com o objetivo final do trabalho (Goloubinoff *et al.*, 1989; Marquart *et al.*, 1996; Picking *et al.*, 1996; Picking *et al.*, 2001; Rudolph e Lilie, 1996; Birket *et al.*, 2007). De acordo com informações contidas no trabalho de Picking *et al.* (1996), diversas proteínas, quando superexpressas em *E. coli*, tendem a ser sequestradas em corpos de inclusão. Isso ocorre para a proteína IpaC quando é expressa a 37°C, por exemplo. Outra característica, própria da proteína, que corrobora para a insolubilidade, é a presença de uma região transmembrânica, como já citado anteriormente, a qual a torna hidrofóbica e, portanto, insolúvel sob determinadas condições (Figura 4).

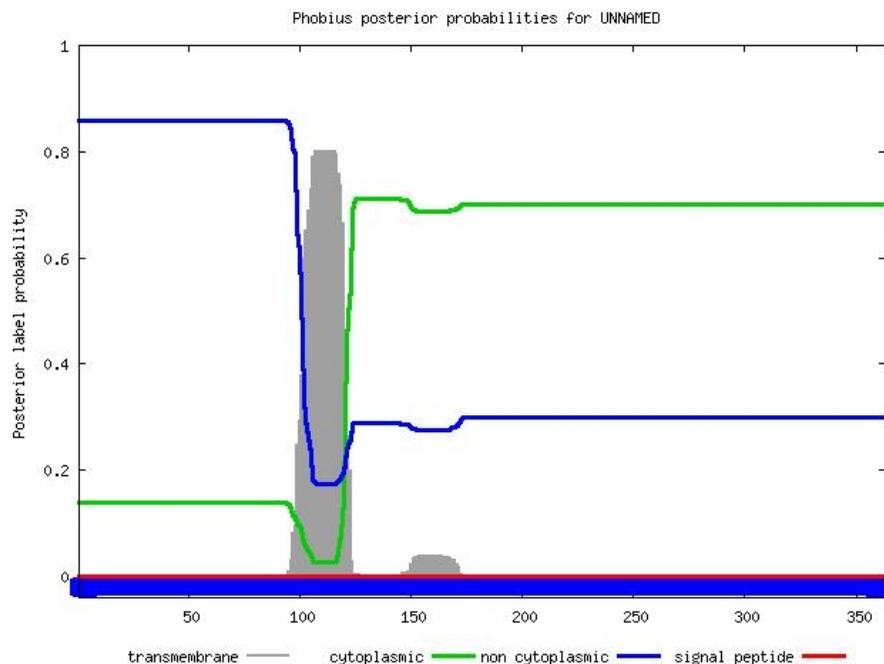


Figura 4. Análise da estrutura da proteína IpaC através do programa Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>). O gráfico destaca a região transmembrânica da proteína responsável por seu comportamento hidrofóbico.

Apesar disso, foi realizada a expressão da proteína nesta temperatura a fim de se otimizar o processo sendo necessária uma alteração: foi adicionado, ao tampão de extração 0,5 % de Triton X-100 com a finalidade de se romper esses corpos de inclusão e solubilizar a proteína. Como mostra a Figura 5, netas condições a expressão é aumentada significativamente e, com isso, uma maior quantidade de proteína (aproximadamente 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IpaC purificada a partir da expressão a 37°C e aproximadamente 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir da expressão a 30°C) pôde ser recuperada quando comparada à expressão a 30°C como descrito por Picking *et al.* (1996).

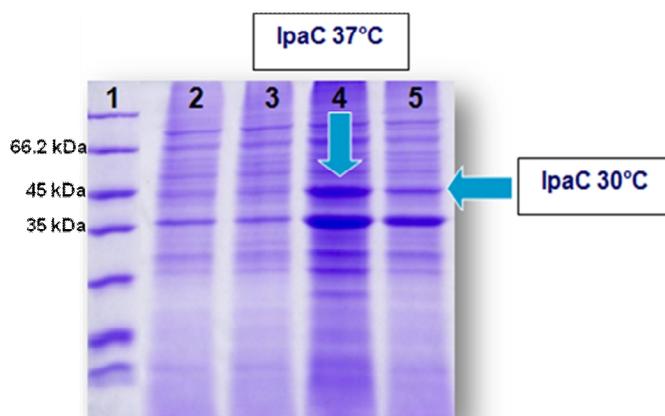


Figura 5. Gel SDS-PAGE a 12%. Teste de expressão. 1: padrão de peso molecular (Unstained Protein Weight Marker, Fermentas). 2: vetor pET28a (sem o gene *ipaC*) a 37°C. 3: pET28a (sem o gene *ipaC*) a 30°C. 4: pET28a (com o gene) a 37°C. 5: vetor pET28a (com o gene) a 30°C.

Logo após a extração, a proteína foi submetida à purificação por cromatografia de afinidade em resina de níquel. O gel de purificação está representado pela Figura 6. É possível observar a presença de uma proteína de 45 kDa (42 kDa da proteína IpaC mais 3 kDa correspondentes à cauda de histidina adicionada à sequência pelo vetor pET28a) expressa e purificada nas frações de 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM de imidazol.

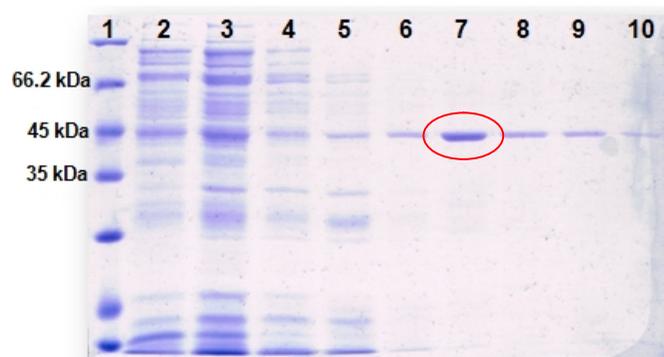
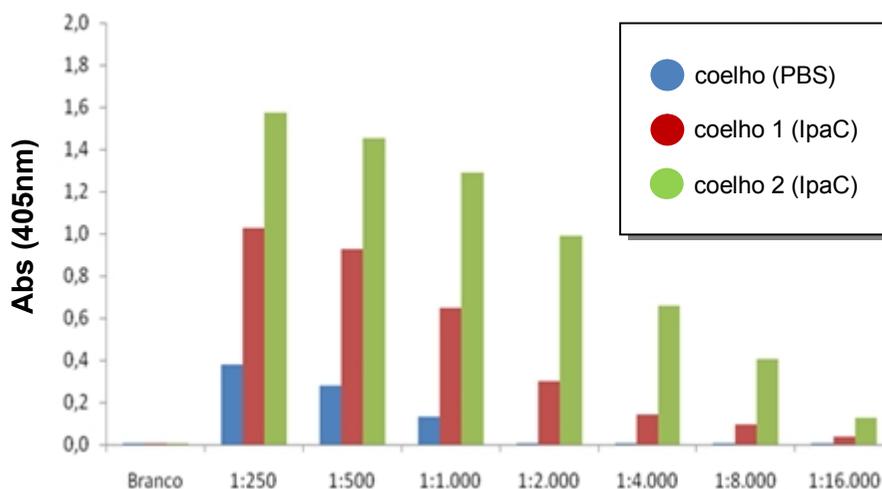


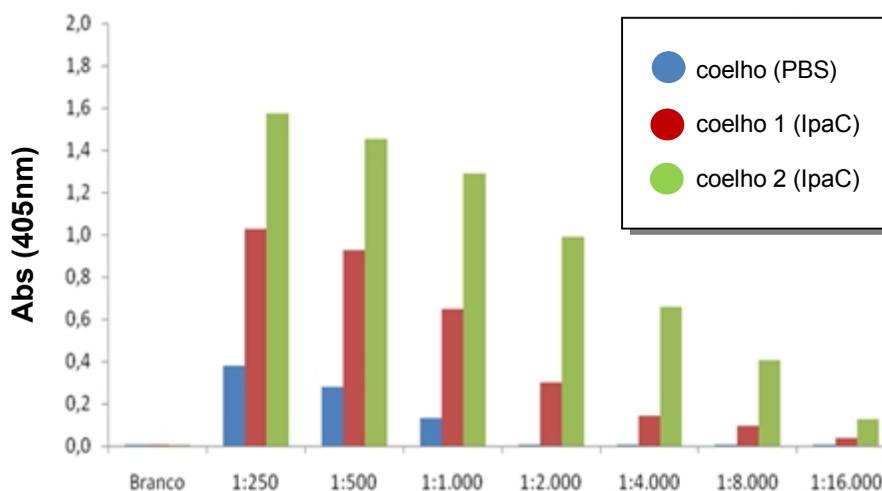
Figura 6. Gel SDS-PAGE a 12%. Purificação da proteína IpaC segundo o teste de expressão da Figura 3. 1: padrão de peso molecular (Unstained Protein Weight Marker, Fermentas). 2 - 10: frações protéicas eluídas com 10, 20, 50 (1ª fração), 50 (2ª fração), 100 (1ª fração), 100 (2ª fração), 200 (1ª fração), 200 (2ª fração) e 500 mM de imidazol. Destaque: banda utilizada na espectrometria de massa.

A fração purificada da proteína IpaC, cuja identidade foi confirmada pela realização da espectrometria de massa, foi utilizada para a produção de anticorpos policlonais. Para isso, as bandas correspondentes à proteína foram recortadas do gel de acrilamida, processadas e inoculadas, via subcutânea em coelhos. Para a detecção da produção dos anticorpos realizou-se, em primeiro lugar, o teste de ELISA. Dessa forma, o antígeno (proteína IpaC) foi dialisado em tampão PBS contendo 300 mM de NaCl, uma vez que a proteína apresenta uma região hidrofóbica muito representativa e necessita, assim, estar em um tampão que contenha uma elevada concentração de sal. De acordo com os resultados observados nas Figuras 7 e 8, a sensibilidade da reação antígeno/anticorpo apresentou-se muito significativa, mesmo com o antígeno mais diluído (Figura 8). Nas mesmas figuras é possível observar também que um dos coelhos desafiados (coelho 2) respondeu melhor à imunização produzindo anticorpos em maior quantidade quando comparado com o outro animal (coelho 1). Frente a esse resultado, em todos os testes imunológicos utilizou-se os anticorpos provenientes do coelho 2.



Diluições seriadas dos anticorpos

Figura 7. Gráfico representando o teste de ELISA com os anticorpos produzidos em coelho. O gráfico mostra a sensibilidade do anticorpo em relação ao antígeno (proteína IpaC) em diferentes diluições. O eixo y corresponde às medidas de absorbância a 405 nm; o eixo x corresponde às diluições seriadas do anticorpo. Neste teste, o antígeno foi diluído 25 vezes (concentração final de 160 $\mu\text{g/mL}$).



Diluições seriadas dos anticorpos

Figura 8. Gráfico representando o teste de ELISA com os anticorpos produzidos em coelho. O gráfico mostra a sensibilidade do anticorpo em relação ao antígeno (proteína IpaC) em diferentes diluições. O eixo y corresponde às medidas de absorbância a 405 nm; o eixo x corresponde às diluições seriadas do anticorpo. Neste teste, o antígeno foi diluído 50 vezes (concentração final 80 $\mu\text{g/mL}$).

Os anticorpos produzidos foram utilizados para verificar se seriam capazes de bloquear a invasão da bactéria *Shigella flexneri* 2a linhagem 2457T em linhagens celulares

cultivadas *in vitro*, e também utilizados com a finalidade de se verificar a integridade da molécula protéica para que fosse possível o reconhecimento antigênico. A Figura 9 mostra a proteína IpaC, expressa em pET28a, sendo reconhecida pelos anticorpos policlonais produzidos.



Figura 9. “Western blot” a partir da purificação da proteína IpaC expressa em pET28a a 37°C. Os anticorpos foram produzidos em coelhos através de inoculação subcutânea do antígeno. Para isso, a banda correspondente à proteína IpaC purificada foi retirada do gel de acrilamida e posteriormente processada. 1: padrão de peso molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas); 2: fração purificada da proteína IpaC expressa a 37°C.

A Figura 10 mostra os resultados obtidos a partir do teste de invasão na presença dos anticorpos em diferentes diluições e tempos de exposição.

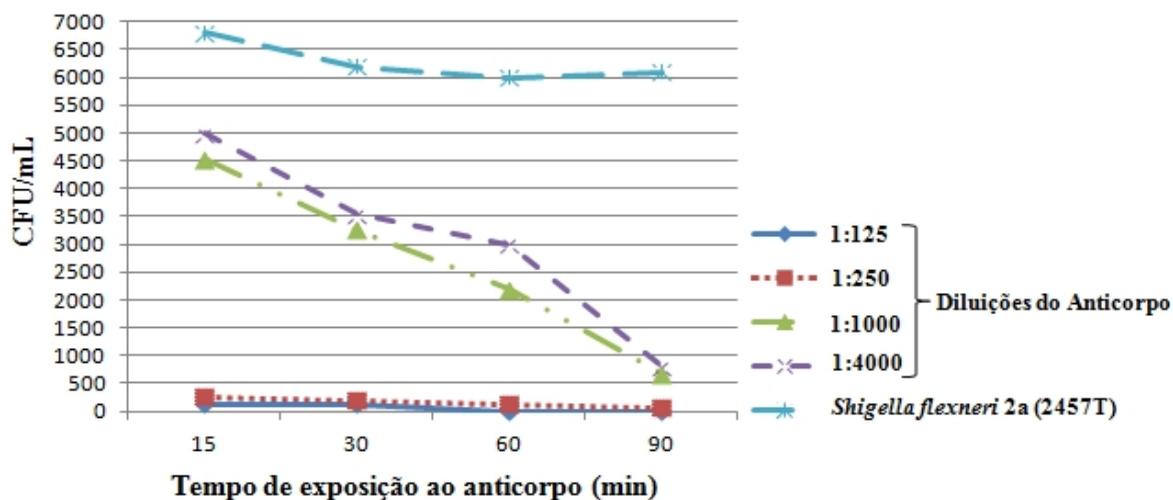


Figura 10. Diferentes diluições dos anticorpos testados em cultura de células HeLa para verificação da inibição da invasão de *S. flexneri*.

Como evidenciado nas Figuras 9 e 10, respectivamente, os anticorpos anti-IpaC, além da capacidade de reconhecer a proteína IpaC, foram também capazes de inibir a entrada da bactéria *S. flexneri* em células HeLa, confirmando, assim, a importância da proteína no processo invasivo e validando a ação inibitória esperada para os anticorpos produzidos. Resultados preliminares já mostraram que a proteína IpaC purificada possui atividades *in vitro* que estão relacionadas à invasão, o que inclui a habilidade de adesão à células epiteliais cultivadas e a habilidade de promover a invasão com linhagens não-invasivas de *S. flexneri* (Bennish, 1991; Marquart *et al.*, 1996).

Após os experimentos bem sucedidos com o vetor pET28a, foram realizados outros com os vetores de expressão para bactérias lácticas: pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut. Na verdade trata-se, originalmente, de dois vetores, sendo que um deles foi mutado e, por isso, possui duas versões: uma que expressa a proteína de interesse e a secreta para o meio extracelular (pT1NX) e a outra versão (mutada) que expressa a proteína no citoplasma da célula bacteriana (pT1NXMut). O outro vetor, chamado pT1NXssAnch expressa a proteína

e esta fica ancorada à parede celular bacteriana. Os vetores estão sob o controle do promotor constitutivo P1 não havendo a necessidade da utilização de um indutor. Na Figura 11 é possível observar o perfil desses plasmídios e na Figura 12 observa-se os mapas dos dois vetores originais, pT1NX e pT1NXssAnch.

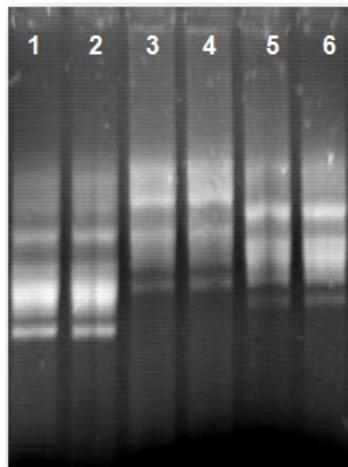


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 0,7%. Extração dos plasmídios de *Lactococcus lactis* recombinantes. 1 e 2: pT1NX/*ipaC*; 3 e 4: pT1NXssAnch/*ipaC*; 5 e 6: pT1NXMut/*ipaC*.

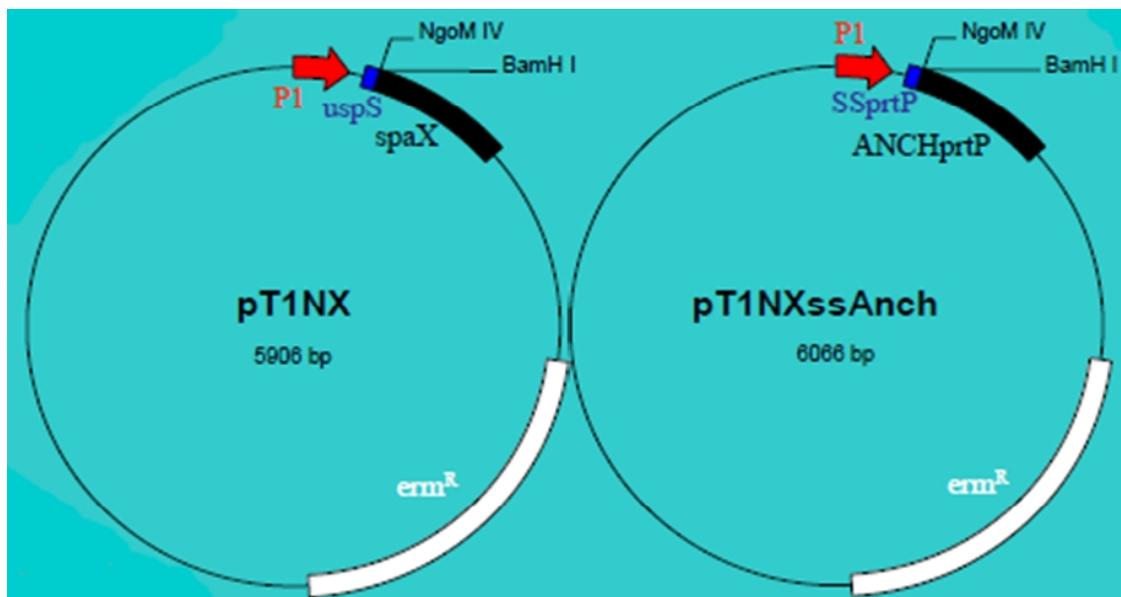


Figura12. Mapa dos vetores de expressão pT1NX e pT1NXssAnch. O vetor pT1NXMut possui a mesma sequência do vetor pT1NX, no entanto, sem a sequência que codifica o peptídeo sinal.

A expressão através de um sistema constitutivo pode ser vantajosa por ser mais apropriada em determinadas situações, como por exemplo, na expressão de antígenos associados à membrana, de antígenos insolúveis em determinadas condições ou ainda quando este antígeno apresenta efeito citotóxico em altas concentrações (Chamberlain *et al.*, 1997). Por outro lado, quando se trabalha com um sistema que permite uma indução ou um controle sobre a taxa de expressão proteica, se não ocorrer nenhuma das características citadas anteriormente, a proteína pode ser expressa em grandes quantidades, o que facilitaria seu uso para experimentos posteriores como purificação, produção de anticorpos, imunização, etc (Kuipers *et al.*, 1997). Neste sentido, o sistema de expressão mais utilizado e mais conhecido hoje em dia é o sistema NICE (Nisin-Controlled Expression) (Kuipers *et al.*, 1993), apesar de existirem vários outros sistemas, tanto indutíveis como constitutivos disponíveis para a bactéria *Lactococcus lactis* (Holmgren e Czerkinsky, 2005; Bermudez-Humaran e Langella, 2010; Wells e Mercenier, 2008).

De acordo com essas informações, um sistema constitutivo seria apropriado para a expressão da proteína IpaC, uma vez que ela apresenta algumas das características citadas como associação à membrana, insolubilidade sob determinadas condições, não podendo ser, assim, expressa em altas concentrações.

Tanto os diferentes vetores de expressão como o gene *ipaC* foram digeridos com as enzimas *NgoMIV*, *BamHI* e *EcoRV* para que se efetuassem as ligações. Introduziu-se as diferentes construções, por eletroporação, na bactéria *Lactococcus lactis* e os clones positivos, resistentes à eritromicina, foram confirmados por PCR de colônia (Figura 13) e por sequenciamento de DNA.

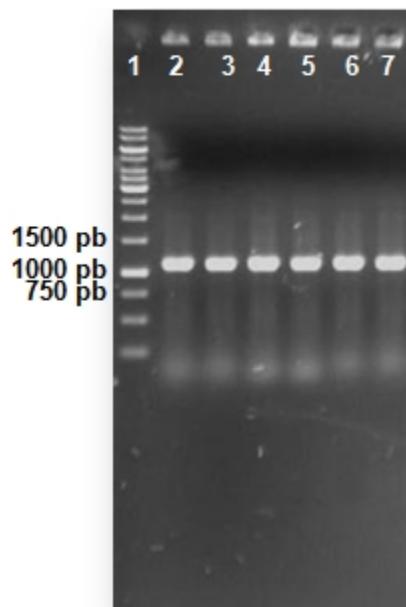


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1%. PCR de colônia para confirmação dos clones positivos para as construções pT1NXMut/*ipaC*, pT1NXssAnch/*ipaC* e pT1NX/*ipaC*. Neste caso os plasmídios carregam a sequência original do gene *ipaC*. 1: padrão de peso molecular (1Kb Ladder, Fermentas); 2 e 3: pT1NXMut/*ipaC*; 4 e 5: pT1NXssAnch/*ipaC*; 6 e 7: pT1NX/*ipaC*.

Após a confirmação dos clones positivos, iniciaram-se os testes de expressão. Como a expressão heteróloga desses vetores é baixa, não foi feita, inicialmente, a coloração do gel de acrilamida com o corante comassie blue, mas sim, realizou-se a coloração com nitrato de prata, uma vez que esse método é mais sensível para a detecção de proteínas em baixas concentrações. A Figura 14 representa a provável expressão da proteína IpaC pelos vetores constitutivos.

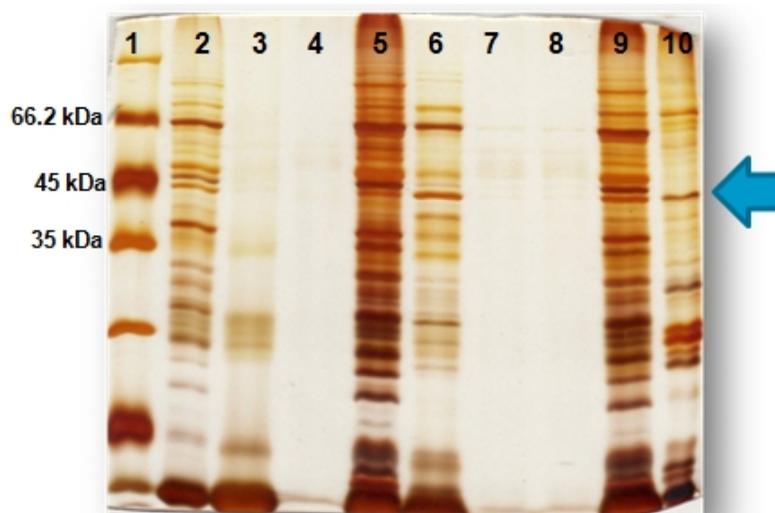


Figura 14. SDS-PAGE a 12% (submetido à coloração de prata) da proteína IpaC expressa nos vetores pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut. 1: padrão de peso molecular (Unstained Protein Weight Marker, Fermentas). 2: *Lactococcus lactis* (fração insolúvel-controle); 3: *Lactococcus lactis* (fração solúvel-controle); 4: *Lactococcus lactis* (sobrenadante-controle); 5: pT1NXMut/*ipaC* (fração insolúvel); 6: pT1NXMut/*ipaC* (fração solúvel); 7: pT1NX/*ipaC* (sobrenadante); 8 (repetição da amostra 7); 9: pT1NXssAnch/*ipaC*; 10: proteína IpaC expressa em pET28a (controle).

É importante salientar que foi confirmada a característica desses vetores de expressarem seus insertos em baixas concentrações, uma vez que não foi possível visualizar nenhum fragmento que tivesse a expressão destacada e que correspondesse ao tamanho esperado da proteína IpaC (42 KDa), mesmo através da coloração com prata. Esse resultado também corrobora o fato de não existir um controle sobre o sistema de expressão e o fato de não existirem muitos trabalhos publicados que envolvem a utilização dos vetores pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut. Frente a isso, o próximo passo para a verificação da expressão seria por meio de testes imunológicos com a utilização dos anticorpos policlonais produzidos em coelhos.

Inicialmente, realizou-se a técnica de “dot-blot”, que apresenta os mesmos princípios do “western-blot”, no entanto, no primeiro caso as amostras não são submetidas à etapa de

transferência; aplica-se o antígeno diretamente na superfície da membrana. A escolha da realização desse teste, em um primeiro momento, ocorreu pelo fato de ser uma técnica mais simples e mais rápida. Depois de algumas tentativas sem sucesso, realizou-se o “western blot”.

Em relação a esta técnica, diversas modificações foram realizadas; (1) o sistema de transferência tradicional, originalmente utilizado, foi substituído por um sistema semi-seco, uma vez que o processo ocorre mais eficientemente; (2) a membrana foi exposta à solução de bloqueio por 18 horas e também na presença do anticorpo primário durante o mesmo período; (3) foi realizado o “western blot” a partir de frações protéicas obtidas através da técnica de imunoafinidade (Figura 15 e 16).

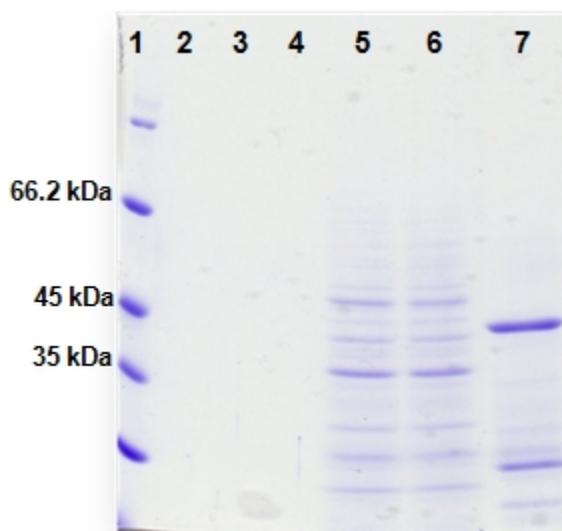


Figura 15. SDS-PAGE a 12%. Imunoafinidade de *Lactococcus lactis*. 1: padrão de peso molecular (Unstained Protein Weight Marker, Fermentas); 2: pT1NX sem inserto (controle negativo); 3: pT1NX/*ipaC*; 4: pT1NXMut/*ipaC*; 5: pT1NXssAnch/*ipaC* centrifugado; 6: pT1NXssAnch/*ipaC* sem centrifugar; 7: pET28a/*ipaC* (controle positivo - expressão a 37°C - fração purificada com 200 mM de imidazol).

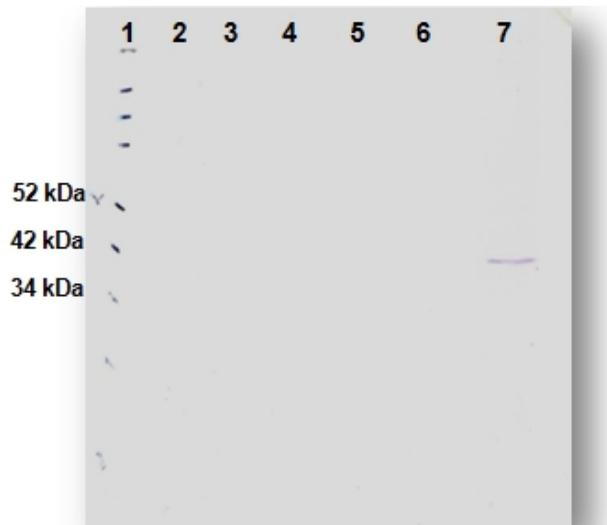


Figura 16. “Western blot” a partir da Imunoafinidade de *Lactococcus lactis*. 1: padrão de peso molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas); 2: pT1NX sem inserto (controle negativo); 3: pT1NX/*ipaC*; 4: pT1NXMut/*ipaC*; 5: pT1NXssAnch/*ipaC* centrifugado; 6: pT1NXssAnch/*ipaC* sem centrifugar; 7: pET28a/*ipaC* (controle positivo - expressão a 37°C - fração purificada com 200 mM de imidazol).

Esta técnica consiste em um sistema de purificação protéica que se baseia na afinidade antígeno-anticorpo. Dessa forma, esperava-se conseguir separar, ou, isolar a proteína IpaC de todo o restante do extrato protéico a fim de facilitar a interação antígeno-anticorpo na técnica de “western blot”; (4) para a revelação, foi utilizado tanto um cromógeno (Figuras 16, 24 e 26) quanto o luminol (Figuras 17 e 18) e um transluminador especial para a revelação daquele reagente, já que este último método é considerado significativamente mais sensível quando comparado ao primeiro.

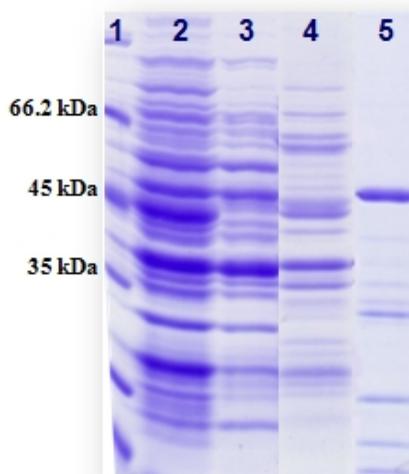


Figura 17. SDS-PAGE a 12%. Expressão da proteína IpaC nos vetores pT1NXssAnch e pT1NXMut e em pET28a. 1: padrão de peso molecular (Unstained Protein Weight Marker, Fermentas). 2: pT1NXssAnch/*ipaC* em *L. lactis*; 3: pT1NXssAnch/*ipaC* em *L. lactis* centrifugada; 4: pT1NXMut em *L. lactis*; 5: pET28a/*ipaC* purificado e concentrado (expressão a 37°C).

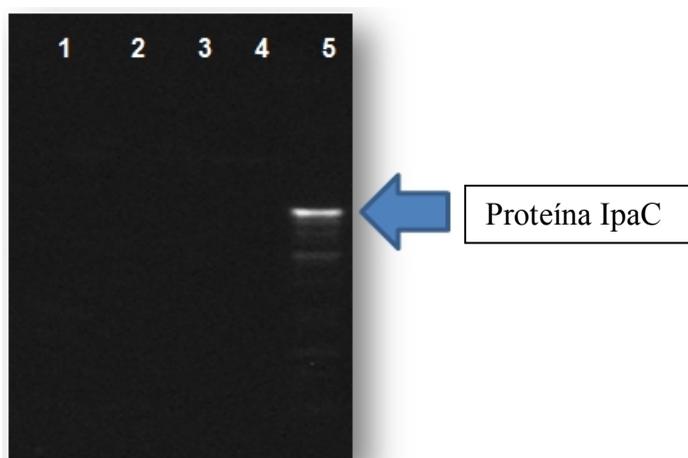


Figura 18. “Western blot” realizado a partir da expressão de IpaC nos vetores pT1NXssAnch, pT1NXMut e pET28a em *L. lactis* e *E. coli*, respectivamente. Revelação com o reagente luminol através de um transluminador especial. 1: padrão de peso molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas); 2: pT1NXssAnch/*ipaC*; 3: pT1NXssAnch/*ipaC* (fração centrifugada); 4: pT1NXMut; 5: pET28a/*ipaC* purificado e concentrado (expressão a 37°C).

Após todas as considerações, notou-se que, provavelmente, o fator limitante para a detecção da proteína não residia na técnica utilizada para isto, mas sim na taxa de expressão protéica. Para todos os testes realizados e discutidos acima, exceto para o primeiro, que foi a técnica de “dot-blot”, detectou-se a expressão do controle positivo (proteína IpaC produzida em pET28a). Dessa forma, uma alternativa considerada foi a presença de códons raros na sequência do gene *ipaC* que poderiam estar dificultando o processo de tradução, e consequentemente, a taxa final de expressão. Como a bactéria *S. flexneri*, que produz originalmente a proteína IpaC, e a bactéria *L. lactis* utilizada neste trabalho na produção heteróloga da proteína, não são relacionadas filogeneticamente, muitos códons utilizados no processo de tradução não são os mesmos para ambas as bactérias. Esta condição já foi descrita por diversos autores, constituindo-se em uma informação muito importante quando se trabalha com expressão heteróloga (Kim e Sin, 2005; Tokuoka *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Muthumani *et al.*, 2008). Ainda segundo Besse e Ephrussi (2008), um grande número de sequências ricas em C-G no RNA mensageiro pode inibir a tradução da proteína devido ao aumento na formação de estruturas secundárias. Além disso, a presença de sítios de processamento do pré-RNA são capazes de causar expressão anômala da sequência alvo.

Frente a todas essas questões, através de uma pesquisa na internet foi encontrada uma página do Laboratório de Genômica Estrutural e Proteômica da Universidade da Califórnia, (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>) em que foi possível, através da sequência original do gene codificante da proteína IpaC, a marcação dos códons raros existentes. A sequência completa do gene *ipaC* e os códons raros marcados em cores diferentes são mostrados na Figura 19.

Red = rare Arg codons **AGG, AGA, CGA**

Green = rare Leu codon **CTA**

Blue = rare Ile codon **ATA**

Orange = rare Pro codon **CCC**

for the following input sequence (*ipaC*):

```
atg gaa att caa aac aca aaa cca acc cag att tta tat aca gat ATA tcc aca
aaa caa act caa agt tct tcc gaa aca caa aaa tca caa aat tat cag cag att
gca gcg cat att cca ctt aat gtc ggt aaa aat CCC gta tta aca acc aca tta
aat gat gat caa ctt tta aag tta tca gag cag gtt cag cat gat tca gaa atc
att gct cgc ctt act gac aaa aag atg aaa gat cgt tca gag atg agt cac acc
ctt act cca gag aac act ctg gat att tcc agt ctt tct tct aat gct gtt tct
tta att att agt gta gcc gtt CTA ctt tct gct ctc cgc act gca gaa act aaa
ttg ggc tct caa ttg tca ttg att gcg ttc gat gct aca aaa tca gct gca gag
aac att gtt cgg caa ggc ctg gca gcc CTA tca tca agc att act gga gca gtc
aca caa gta ggt ATA acg ggt atc ggt gcc aaa aaa acg cat tca ggg att agc
gac caa aaa gga gcc tta AGA aag aac ctt gcc act gct caa tct ctt gaa aaa
gag ctt gca ggt tct aaa tta ggg tta aat aaa caa ATA gat aca aat atc acc
tca cca caa act aac tct agc aca aaa ttt tta ggt aaa aat aaa ctg gcg cca
gat aat ATA tcc ctg tca act gaa cat aaa act tct ctt agt tct CCC gat att
tct ttg cag gat aaa att gac acc cag AGA AGA act tac gag ctc aat acc ctt
tct gcg cag caa aaa caa aac att ggc cgt gca aca atg gaa aca tca gcc gtt
gct ggt aat ATA tcc aca tca gga ggg cgt tat gca tct gct ctt gaa gaa gaa
gaa caa CTA atc agt cag gcc agc agt aaa caa gca gag gaa gca tcc caa gta
tct aaa gaa gca tcc caa gcg aca aat caa tta ATA caa aaa tta ttg aat ATA
att gac agc atc aac caa tca aag aat tcg aca gcc agt cag att gct ggt aac
att CGA gct taa
```

Figura 19. Indicação dos códons raros existentes na sequência do gene *ipaC* a partir de um software chamado Rare Codon Calculator desenvolvido pelo Laboratório de Genômica Estrutural e Proteômica da Universidade da Califórnia, Los Angeles.

Frente à significativa quantidade desses códons encontrados na sequência do gene, resolveu-se utilizar uma nova estratégia para a substituição destes códons pelos mais frequentemente utilizados pelas bactérias lácticas em seu processo de tradução. Para isso, a

sequência original do gene *ipaC* foi otimizada pela empresa Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>) (Figura 20). A partir da nova sequência, a empresa realizou a síntese do gene e sua inserção em um vetor específico de clonagem chamado pIDTBlue (Figura 21) este vetor foi introduzido, por transformação, na bactéria *E. coli* DH10 β , extraído e, em seguida, a nova sequência do gene foi sub-clonada nos vetores pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut para a realização da expressão. Todos os experimentos envolvendo a preparação desse novo vetor (pIDTBlue) foram realizados de acordo com as especificações da empresa IDTDNA.

Sequência do gene *ipaC* otimizada pela empresa IDT (para *L. lactis*):

GATATCATGGAAATACAAAATACTAAACCTACGCAGATTTTGTATACCGATATTAGTACAAAACAAACACA
 ATCATCATCAGAAACGCAAAAAAGTCAAAATTACCAACAGATCGCTGCGCATATCCCCTTAACGTAGGCA
 AAAATCCTGTTTTAACGACCACATTAACGATGATCAATTGCTTAACTTTTCAGAACAAGTTCAACATGACT
 CAGAAATTATTGCTCGTTTGACTGATAAAAAATGAAGGATCGCTCTGAAATGTCACATACACTTACTCCTG
 AAAATACTCTTGATATAAGTAGTTTGTCTTCTAATGCAGTATCATTGATTATTAGTGTGCTGTTTTACTTAG
 TGCTCTTCGTACGGCTGAAACAAAGTTGGGTTCTCAATTAAGTTTAATCGCTTTTGATGCAACAAAATCAGC
 TGCTGAAAATATCGTTCGTCAGGGTTGGCAGCATTGTCATCTTCAATTACTGGAGCTGTTACTCAAGTAGG
 AATCACTGGTATCGGAGCGAAAAAACGCATAGTGGTATTTTCAGATCAGAAAGGAGCTTTAAGAAAAAATT
 TAGCTACTGCCCAATCTTTAGAAAAAGAAGTTGCGGGTAGTAAATTGGGTTTAAATAAGCAAATAGATAACC
 AATATACTTCTCCTCAAACAAATTCTAGTACAAAGTTTTAGGAAAAAATAAATTGGCACCTGATAATATC
 TCACTTAGTACAGAACATAAACTAGTTTGTCTTCTCCAGATATTAGTCTTCAAGATAAAATTGATACTCAA
 CGCCGTACTTATGAATTAATACTTTCAGCTCAACAAAAGCAAAATATTGGCAGAGCTACTATGGAAAC
 AAGTGCCGTAGCCGGTAACATTTCTACTAGTGGGGGACGTTATGCATCAGCGCTTGAGGAAGAAGAACAAC
 TTATTTACAAGCATCATCAAAACAGGCCGAAGAAGCGAGTCAAGTCTCTAAGGAAGCATCACAGGCAACT
 AATCAATTGATCCAAAAATTATTGAATATTATTGATTCATAAAACCAAGTAAAAATTCAACAGCTTCACAA
 ATCGCCGGCAATATTAGAGCTTAAGGATCC

Figura 20. Sequência original e sequência otimizada do gene *ipaC*. Na sequência otimizada, as bases nitrogenadas sublinhadas correspondem aos sítios de restrição *EcoRV* e *BamHI*, respectivamente, inseridos para a subclonagem no vetor pT1NXMut. Os sítios de restrição para subclonagem nos outros dois vetores (pT1NX e pT1NXssAnch) foram inseridos através de PCR.

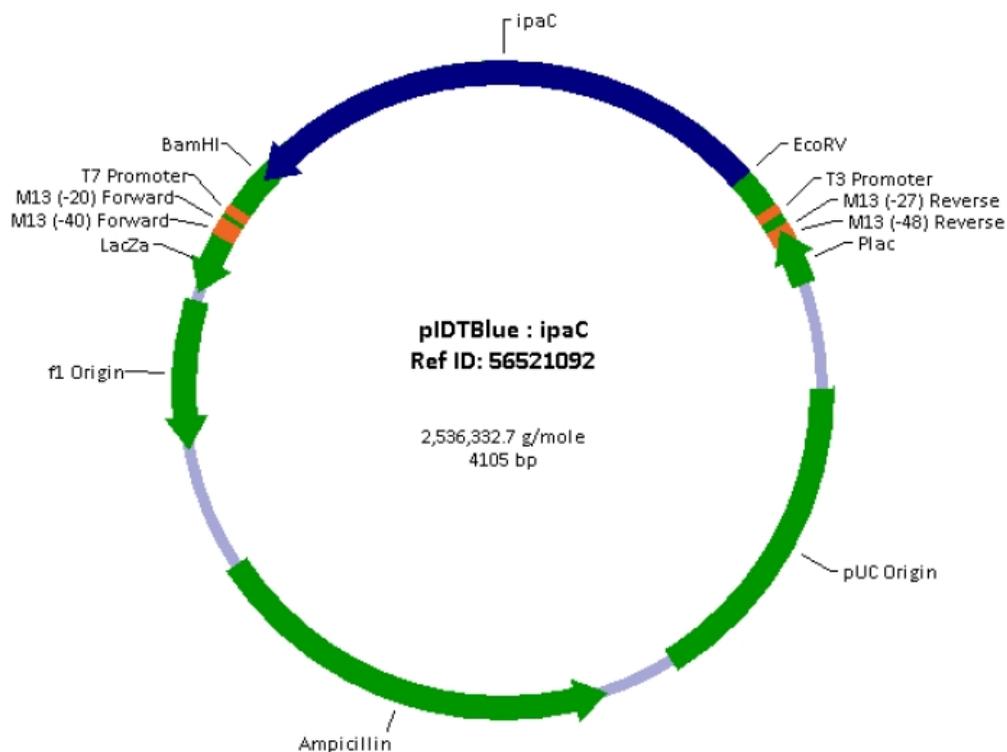


Figura 21. Mapa do vetor de clonagem pIDTBlue. A sequência otimizada do gene *ipaC* foi inserida dentro deste vetor (trecho em azul) para posterior subclonagem nos vetores pT1NX, pT1NXssAnch e pT1NXMut.

Mesmo após a síntese da sequência otimizada do gene *ipaC* e da inserção dessa nova sequência nos vetores constitutivos para *L. lactis*, não houve mudança significativa no padrão de expressão observado até então. Os clones positivos para o vetor pIDTBlue (Figura 22), resistentes à ampicilina, foram sequenciados para a verificação da integridade da sequência do gene e nenhum erro foi encontrado.

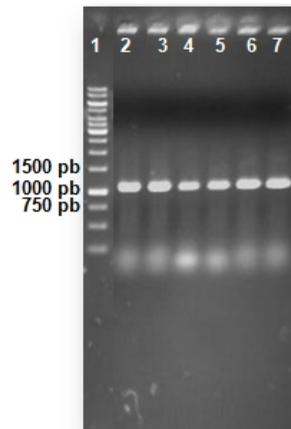


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose a 1%. PCR de colônia para confirmação dos clones positivos para as construções pT1NXMut/*ipaC*, pT1NXssAnch/*ipaC* e pT1NX/*ipaC*. Neste caso os plasmídios carregam a sequência otimizada do gene *ipaC*. 1: padrão de peso molecular (1Kb Ladder, Fermentas); 2 e 3: pT1NXMut/*ipaC*; 4 e 5: pT1NXssAnch/*ipaC*; 6 e 7: pT1NX/*ipaC*.

Como não foi possível obter um resultado positivo com a expressão constitutiva, uma vez que para esse sistema específico de expressão não há um controle, ou seja, não se pode usar um indutor, realizaram-se testes de expressão baseados no tempo de crescimento bacteriano, como uma alternativa. Dessa forma, as bactérias lácticas carregando tanto as construções com o gene *ipaC* otimizado como a sequência original, foram crescidas por 18 horas, durante o dia até atingir a fase estacionária (por 10 horas) e até atingir a fase logarítmica. Apesar de todos esses testes, como mostrado nas Figuras 23, 24, 25 e 26, não se observou diferença na expressão da proteína IpaC especificamente. A única diferença foi em relação à quantidade de proteína total produzida, que foi maior para a cultura que cresceu por 18 horas. A fase de crescimento não foi, portanto, um fator limitante para a obtenção de resultados mais satisfatórios.

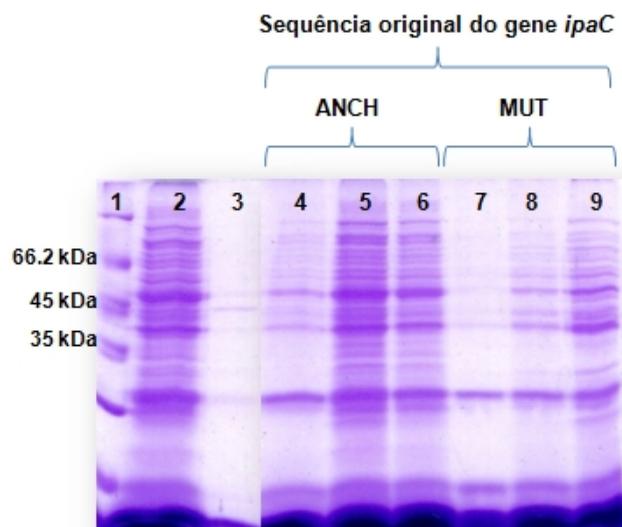


Figura 23. SDS-PAGE a 12%. Análise da expressão da proteína IpaC nos vetores pT1NXssAnch e pT1NXMut em diferentes fases do crescimento bacteriano. 1: padrão de peso molecular (Unstained Protein Weight Marker, Fermentas). 2: pT1NXssAnch sem o gene *ipaC* (controle negativo); 3: proteína IpaC expressa a 37°C em pET28a/*ipaC* (controle positivo); 4: pT1NXssAnch/*ipaC* (fase logarítmica); 5: pT1NXssAnch/*ipaC* (fase estacionária - 18 horas de crescimento); 6: pT1NXssAnch/*ipaC* (fase estacionária - 10 horas de crescimento); 7: pT1NXMut/*ipaC* (fase logarítmica); 8: pT1NXMut/*ipaC* (fase estacionária - 10 horas de crescimento); 9: pT1NXMut/*ipaC* (fase estacionária - 18 horas de crescimento).



Figura 24. “Western blot” a partir da expressão da proteína IpaC (a partir da sequência original do gene *ipaC*) nos vetores pT1NXssAnch e pT1NXMut em diferentes fases do crescimento bacteriano. 1: padrão de peso molecular (Spectra® Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas); 2: proteína IpaC expressa a 37°C em pET28a/*ipaC* (controle positivo); 3: pT1NXssAnch/*ipaC* (fase logarítmica) 4: pT1NXssAnch/*ipaC* (fase estacionária - 10 horas de crescimento); 5: pT1NXssAnch/*ipaC* (fase estacionária - 18 horas de crescimento); 6 - 8: o mesmo padrão só que para a construção pT1NXMut/*ipaC*; 9: pT1NXssAnch sem o gene *ipaC* (controle negativo).

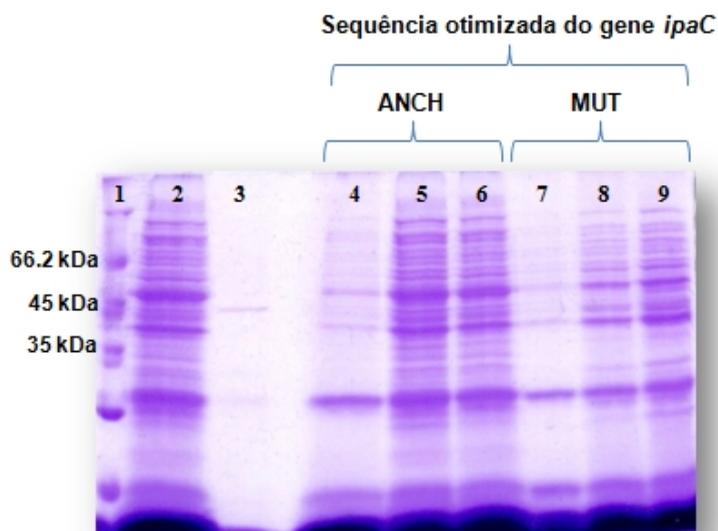


Figura 25. SDS-PAGE a 12%. Análise da expressão da proteína IpaC (a partir da sequência otimizada do gene *ipaC*) nos vetores pT1NXssAnch e pT1NXMut em diferentes fases do crescimento bacteriano. 1: padrão de peso molecular (Unstained Protein Weight Marker, Fermentas); 2: pT1NXssAnch sem o gene *ipaC* (controle negativo); 3: proteína IpaC expressa a 37°C em pET28a/*ipaC* (controle positivo); 4: pT1NXssAnch/*ipaC* (fase logarítmica); 5: pT1NXssAnch/*ipaC* (fase estacionária - 18 horas de crescimento); 6: pT1NXssAnch/*ipaC* (fase estacionária - 10 horas de crescimento); 7: pT1NXMut/*ipaC* (fase logarítmica); 8: pT1NXMut/*ipaC* (fase estacionária - 10 horas de crescimento); 9: pT1NXMut/*ipaC* (fase estacionária - 18 horas de crescimento).

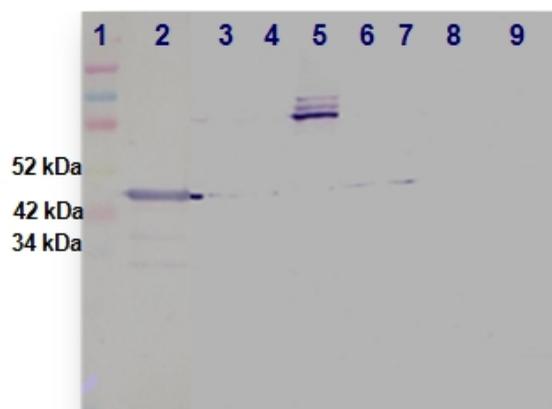


Figura 26. “Western blot” a partir da expressão da proteína IpaC (a partir da sequência otimizada do gene *ipaC*) nos vetores pT1NXssAnch e pT1NXMut em diferentes fases do crescimento bacteriano. 1: padrão de peso molecular (Spectra® Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas); 2: proteína IpaC expressa a 37°C em pET28a/*ipaC* (controle positivo); 3: pT1NXssAnch/*ipaC* (fase logarítmica) 4: pT1NXssAnch/*ipaC* (fase estacionária - 10 horas de crescimento); 5: pT1NXssAnch/*ipaC* (fase estacionária - 18 horas de crescimento); 6 - 8: o mesmo padrão só que para a construção pT1NXMut/*ipaC*; 9: pT1NXssAnch sem o gene *ipaC* (controle negativo).

Outro fator que poderia ser considerado para explicar a ineficácia na detecção da proteína através do gel de acrilamida e, em seguida, através da técnica de “western blot”, seria a dificuldade em se trabalhar com a proteína IpaC devido a características moleculares já discutidas anteriormente, como, por exemplo, a presença de uma região hidrofóbica muito significativa e que define seu comportamento em solução (High *et al.*, 1992; Menard *et al.*, 1993; Tran *et al.*, 2000).

Frente à impossibilidade de seguir com os experimentos inicialmente propostos no presente trabalho que envolviam a utilização das proteínas produzidas pelas bactérias lácticas no desenvolvimento de anticorpos pelos animais desafiados, realizou-se uma técnica que permitisse a detecção da proteína IpaC diretamente na célula bacteriana. Para isso, foi realizada a técnica de imunocitoquímica, normalmente aplicada a tecidos e células eucarióticas. Esta técnica baseia-se na detecção da expressão de uma proteína específica através da reação antígeno-anticorpo e permite a observação dos resultados por microscopia óptica. A observação da reação ocorreu através da atividade da peroxidase (o anticorpo secundário utilizado era conjugado à peroxidase) que foi revelada pela diaminobenzidina (DAB) em presença de peróxido de hidrogênio. O resultado pôde ser facilmente visualizado através do aparecimento de uma coloração castanha onde existe a proteína. Para a melhor visualização das células bacterianas, realizou-se uma contra-coloração com o corante violeta genciana. Dessa forma, para a visualização da proteína IpaC nas células bacterianas (tanto em *L. lactis* como em *E. coli*) utilizou-se os anticorpos produzidos em coelhos como descrito na seção Material e Métodos.

Depois de realizadas todas as otimizações em relação à técnica de imunocitoquímica, foi possível constatar a expressão da proteína IpaC tanto para os primeiros clones (construções com a sequência original do gene *ipaC*) como para os clones novos

(construções com a sequência otimizada do gene *ipaC*) (Figura 27). É importante destacar que nas Figuras 27-B e 27-C a intensidade da coloração revelada pela interação antígeno-anticorpo é maior quando comparada à intensidade da coloração das Figuras 27-D e 27-E. Esse resultado confirma os dados obtidos através da realização de PCR em tempo real (Figura 28), onde se observa uma maior taxa de transcrição gênica do gene *ipaC* no vetor pT1NXssAnch quando comparada à taxa de transcrição do mesmo gene pelos outros vetores. Para a realização desta última técnica utilizou-se como normalizador (controle endógeno) o gene *rpoA* de *L. lactis* linhagem MG1363.

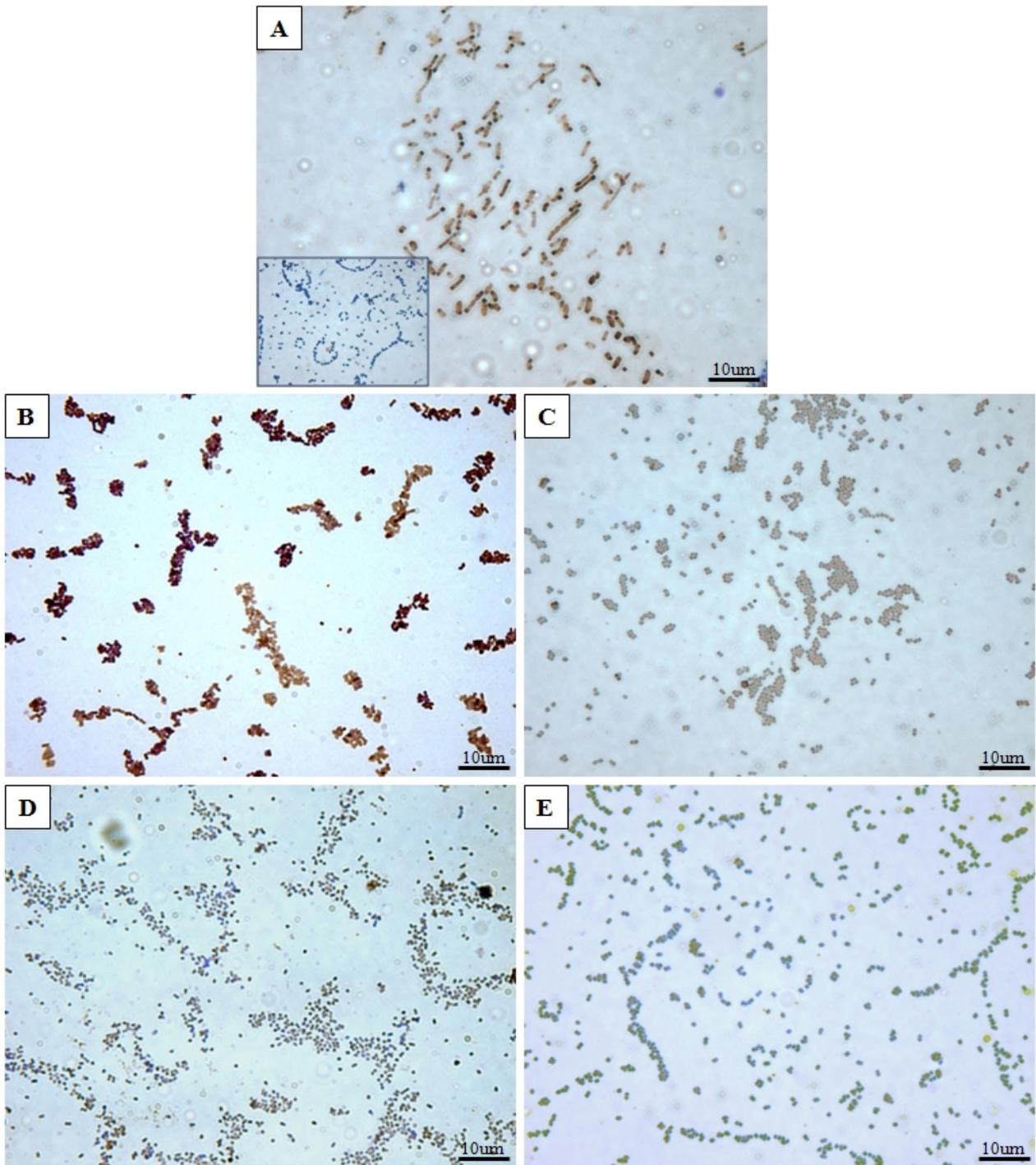


Figura 27. Imunocitoquímica dos clones de *L. lactis* e *E. coli* expressando a proteína IpaC nos vetores pT1NXssAnch, pT1NXMut e pET28a, respectivamente. A: *E. coli* com a construção pET28a/*ipaC* (controle positivo) - no destaque: *L. lactis* com a construção pT1NXssAnch/*ipaC* (controle negativo); B: *L. lactis* com a construção pT1NXssAnch/*ipaC* (sequência *ipaC* original); C: *L. lactis* com a construção pT1NXssAnch/*ipaC* (sequência *ipaC* otimizada); D: *L. lactis* com a construção pT1NXMut/*ipaC* (sequência *ipaC* original); E: *L. lactis* com a construção pT1NXMut/*ipaC* (sequência *ipaC* otimizada).

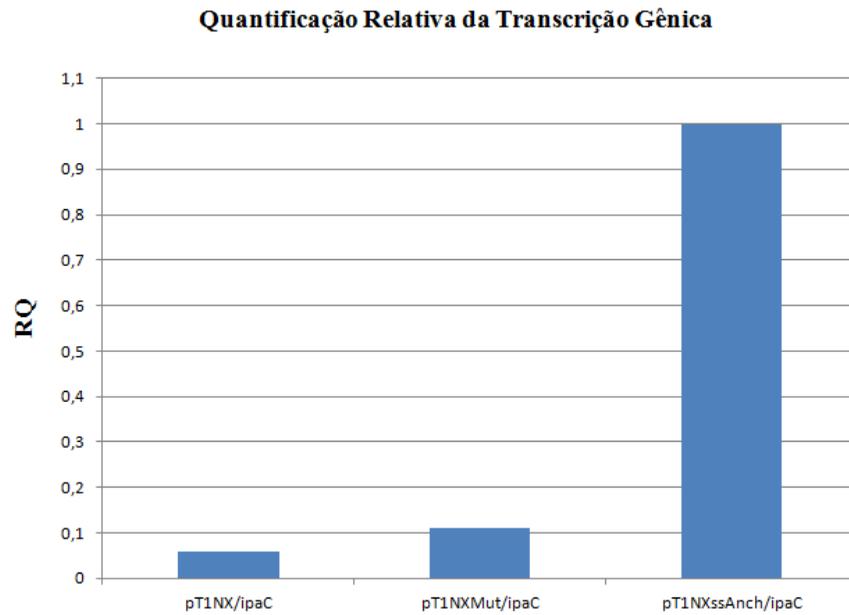


Figura 28. Representação da taxa de transcrição relativa do gene *ipaC* nos vetores pT1NX, pT1NXMut e pT1NXssAnch em *L. lactis*. Para a quantificação determinou-se a transcrição do gene *ipaC* no vetor pT1NXssAnch como calibrador para o cálculo da taxa de transcrição nas outras duas construções.

CONCLUSÃO

Após a realização de todos os experimentos descritos ao longo do presente trabalho, observa-se que existem muitas limitações quando se trabalha com vetores de expressão que não são amplamente utilizados, que apresentam protocolos ainda não tão bem estabelecidos sob condições adversas e que, além de todas essas características, não permitem que haja um controle sobre o sistema de expressão.

Apesar dessas limitações, observou-se a expressão da proteína IpaC diretamente nas células bacterianas pela técnica de imunocitoquímica e através da quantificação da transcrição com o uso da técnica de PCR em tempo real. A expressão apenas não foi detectada através dos géis e através da técnica de “western blot”.

Por outro lado, quando se utilizou o sistema pET, foi observada uma significativa produção da proteína IpaC em frações purificadas tornando possível sua utilização em testes posteriores. Estes resultados obtidos através da expressão heteróloga em *E. coli* permitiram também a produção de anticorpos que foram capazes de reconhecer a proteína IpaC e inibir a adesão e invasão da bactéria *S. flexneri* 2a linhagem 2457T, confirmando a importância dessa proteína no processo invasivo de *Shigella* e sua possível utilização no desenvolvimento de uma vacina contra a shigelose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M. T. G.; Silva, R. M.; Donaire, L. M.; Moreira, L. E.; Martinez, M. B. (1998) Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in children. *J. Pediatr.* 74: 291-298.

Ashkenazi, S., Levy, I., Kazaronovski, V.; Samra, Z. (2003) Growing antimicrobial resistance of *Shigella* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 427-429.

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

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

Beatty, W. L. and Sansonetti, P. J. (1997) Role of lipopolysaccharide in signaling to subepithelial polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 65: 4395-4404.

Bennish, M. L. (1991) Potentially lethal complications of shigellosis. *Rev. Infect. Dis.* 13: S319-S324.

Bennish, M. L. and Wojtyniak, B. J. (1991) Mortality due to shigellosis: community and hospital data. *Rev. Infect. Dis.* 13: S245-S251.

Bermudez-Humaran, L. G.; Cortes-Perez, N. G.; Lefevre, F.; Guimaraes, V.; Rabot, S.; Alcocer-Gonzalez, J. M.; Gratadoux, J. J.; Rodriguez-Padilla, C.; Tamez-Guerra, R. S.; Corthier, G.; Gruss, A.; Langella, P. (2005) A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J. Immunol.* 175: 7297-7302.

Bermudez-Humaran, L. G. and Langella, P. (2010) Perspectives for the development of human papillomavirus vaccines and immunotherapy. *Expert. Rev. Vaccines.* 9: 35-44.

Besse, F. and Ephrussi, A. (2008) Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 971-80.

Biet, F., Loch, C.; Kremer, L. (2002) Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *J. Mol. Med.* 80: 147-162.

Birket, S. E.; Harrington, A. T.; Espina, M.; Smith, N. D.; Terry, C. M.; Darboe, N.; Markham, A. P.; Middaugh, C. R.; Picking, W. L.; Picking, W. D. (2007) Preparation and Characterization of Translocator/Chaperone Complexes and Their Component Proteins from *Shigella flexneri*. *Biochemistry.* 46: 8128-8137

Blocker, A.; Gounon, P.; Larquet, E.; Niebuhr, K.; Cabiaux, V.; Parsot, C.; Sansonetti, P. J. (1999) The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into hosts membranes. *J. Cell Biol.* 147: 683–693.

Bodhidatta L.; Pitisuttithum P.; Chamnachanan S.; Islam D.; Venkatesan M. M.; Mason C. J. (2011) Clinical aspects of an evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy of WRSS1, an oral live attenuated *Shigella sonnei* vaccine candidate, in Thai adults. DMID International Research in Infectious Diseases Meeting. Bethesda, Maryland. 31 May - 2 June 2011.

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

Bopp, C. A.; Brenner, F. W.; Fields, P. I.; Wells, J. G.; Strockbine, N. A. (2003) *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In PR Murray, E. J.; Baron, J. H.; Jorgensen, M. A.; Tenover, R. C.; Tenover, R. H. Tenover (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., American Society of Microbiology, Washington DC, p. 654-671.

Cerutti, A. (2008) Location, location, location: B-cell differentiation in the gut lamina propria. *Mucosal Immunol.* 1: 8-10.

Chamberlain, L. M.; Wells, J. M.; Robinson, K.; Schofield, K. M.; Le Page, R. W. F. (1997) Mucosal immunisation with recombinant *Lactococcus lactis*. p. 83-106. In Pozzi, G. and Wells, J. M. (ed.), *Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunisation*. Biotechnology Intelligence Unit. Landes, Austin, U.S.A.

Chang, T. L.; Chang, C. H.; Simpson, D. A.; Xu, Q.; Martin, P. K.; Lagenaur, L. A.; Schoolnik, G. K.; Ho, D. D.; Hillier, S. L.; Holodniy, M.; Lewicki, J. A.; Lee, P. P. (2003) Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11672–11677.

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

Clinical and Laboratory Standards Institute (2010) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. Approved Standard, M07-A8, Eighth edition. CLSI, Wayne, PA, USA.

Cohen, D., Block, C., Green, M. S., Lowell, G. H. and Ofek, I. (1989) Immunoglobulin M, A and G antibody response to lipopolysaccharide O antigen in symptomatic and asymptomatic *Shigella* infections. *J. Clin. Microbiol.* 27: 162–167.

Cortes-Perez, N. G.; Kharrat, P.; Langella, P.; Bermudez-Humaran, L. G. (2009) Heterologous production of human papillomavirus type-16 L1 protein by a lactic acid bacterium. *BMC Res. Notes* 2: 167.

Cortes-Perez, N. G.; Lefevre, F.; Corthier, G.; Adel-Patient, K.; Langella, P.; Bermudez-Humaran, L. G. (2007) Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria, *Vaccine* 25: 6581–6588.

Daniel, C.; Sebbane, F.; Poiret, S.; Goudercourt, D.; Dewulf, J.; Mullet, C.; Simonet, M.; Pot, B. (2009) Protection against *Yersinia pseudotuberculosis* infection conferred by a *Lactococcus lactis* mucosal delivery vector secreting LcrV. *Vaccine* 27: 1141–1144.

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

De Geyter, C.; Vogt, B.; Benjelloun-Touimi, Z.; Sansonetti, P. J.; Ruyschaert, J. M.; Cabiaux, V. (1997) Purification of IpaC, a protein involved in entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells and characterization of its interaction with lipid membranes. *FEBS Lett.* 400: 149–154.

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

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

Dinari, G., Hale, T. L.; Austin, S. W.; Formal, S. B. (1987) Local and systemic antibody responses to *Shigella* infection in Rhesus monkeys. *J. Infect. Dis.* 155: 1065–1069.

Diniz-Santos, D. R.; Santana, J. S.; Barretto, J. R.; Andrade, M. G.; Silva, L. R. (2005) Epidemiological and microbiological aspects of acute bacterial diarrhea in children from Salvador, Bahia, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 9:77-83.

Enninga, J.; Mounier, J.; Sansonetti, P.; Tran Van Nhieu, G. (2005) Secretion of type III effectors into host cells in real time. *Nat. Methods.* 2: 959-65.

Ewing, B. and Green, P. (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Gen. Res.* 8: 186-194.

Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M.; Green, P. (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Gen. Res.* 8: 175-185.

ExPASy Bioinformatics Resource Portal. Disponível em: <<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>>. Acesso em: 16 de nov. 2009.

Formal, S. B.; Oaks, E. V.; Olsen, R. E.; Wingfield-Eggleston, M.; Snoy, P. J.; Cogan, J. P. (1991) Effect of prior infection with virulent *Shigella flexneri* 2a on the resistance of monkeys to subsequent infection with *Shigella sonnei*. *J. Infect. Dis.* 164: 533–537.

Fulla, N.; Prado, V.; Duran, C.; Lagos, R.; Levine, M. M. (2005) Surveillance for antimicrobial resistance profiles among *Shigella* species isolated from a semirural community in the northern administrative area of Santiago, Chile. *Am J Trop Med Hyg* 72: 851-854.

Goloubinoff, P. A.; Gatenby, J. T.; Lorimer, G. H. (1989) GroE heatshock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature*. 337: 44-47.

Gordon, D.; Abajian, C.; Green, P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Gen. Res.* 8: 195-202.

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

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

Handa, Y.; Suzuki, M.; Ohya, K.; Iwai, H.; Ishijima, N.; Koleske, A. J.; Fukui, Y.; Sasakawa, C. (2007) *Shigella* IpgB1 promotes bacterial entry through the ELMO-Dock180 machinery. *Nat. Cell Biol.* 9:121-8.

Harrington, A. T.; Hearn, P. D.; Picking, W. L.; Barker, J. R.; Wessel, A.; Picking, W. D. (2003) Structural characterization of the N terminus of IpaC from *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 71: 1255-1264.

Hathaway, L. J.; Griffin, G. E.; Sansonetti, P. J.; Edgeworth, J. D. (2002) Human monocytes kill *Shigella flexneri* but then die by apoptosis associated with suppression of proinflammatory cytokine production. *Infect. Immun.* 70: 3833-3842.

High, N.; Mounier, J.; Prevost, M.C.; Sansonetti, P. J. (1992) IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J.* 11: 1991-1999.

Holmgren, J. and Czerkinsky, C. (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* 11: S45-53.

Hueck, C. J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 379-433.

IDT Integrated DNA Technologies. Disponível em: <<http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>>. Acesso em 10 de jan. 2011.

Islam, D.; Bardhan, P. K.; Lindberg, A. A.; Christensson, B. (1995) *Shigella* infection induces cellular activation of T and B cells and distinct species-related changes in peripheral blood lymphocyte subsets during the course of the disease. *Infect. Immun.* 63: 2941-2949.

Islam, D. and Christensson, B. (2000) Disease dependant changes in T-cell populations in patients with shigellosis. *APMIS* 108: 251–260.

Islam, D.; Veress, B.; Bardhan, P. K.; Lindberg, A. A. and Christensson, B. (1997) Quantitative assessment of IgG and IgA subclass producing cells in rectal mucosa during shigellosis. *J. Clin. Pathol.* 50: 513–520.

Islam, D.; Wretling, B.; Lindberg, A. A.; Christensson, B. (1996) Changes in the peripheral blood T-cell receptor *V* b repertoire in vivo and in vitro during shigellosis. *Infect. Immun.* 64: 1391–1399.

Jin, Q.; Yuan, Z.; Xu, J.; Wang, Y.; Shen, Y.; Lu, W.; Wang, J.; Liu, H.; Yang, J.; Yang, F.; Zhang, X.; Zhang, J.; Yang, G.; Wu, H.; Qu, D.; Dong, J.; Sun, L.; Xue, Y.; Zhao, A.; Gao, Y.; Zhu, J.; Kan, B.; Ding, K.; Chen, S.; Cheng, H.; Yao, Z.; He, B.; Chen, R.; Ma, D.; Qiang, B.; Wen, Y.; Hou, Y.; Yu, J. (2002) Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res.* 30: 4432–4441.

Jones, F. R.; Sanchez, J.L.; Meza, R.; Batsel, T. M.; Burga, R.; Canal, E.; Block, K.; Perez, J.; Bautista, C.T.; Escobedo, J.; Walz, S.E. (2004). Short report: High incidence of shigellosis among Peruvian soldiers deployed in the Amazon River basin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70: 663-665.

Kaminski, R. W. and Oaks, E. V. (2009) Inactivated and subunit vaccines to prevent shigellosis. *Expert Rev. Vaccines* 8:1693-704.

Kaminski, R. W.; Turbyfill, K. R.; Oaks, E. V. (2006) Mucosal adjuvant properties of the *Shigella* Invasin Complex. *Infect. Immun.* 74: 2856-66.

Kim, M. S. and Sin, J. I. (2005) Both antigen optimization and lysosomal targeting are required for enhanced anti-tumour protective immunity in a human papillomavirus E7-expressing animal tumour model. *Immunology.* 116: 255-66.

Kotloff, K. L.; Noriega, F. R.; Samandari, T.; Sztein, M. B.; Losonsky, G. A.; Nataro, J. P.; Picking, W. D.; Barry, E. M.; Levine, M. M. (2000) *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1207, with specific deletions in virG, sen, set and guaBA, is highly attenuated in humans. *Infect. Immun.* 68: 1034–1039.

Kotloff, K. L.; Pasetti, M. F.; Barry, E. M.; Nataro, J. P.; Wasserman, S. S.; Sztein, M. B.; Picking, W. D.; Levine, M. M. (2004) Deletion in the *Shigella* enterotoxin genes further attenuates *Shigella flexneri* 2a bearing guanine auxotrophy in a phase 1 trial of CVD 1204 and CVD 1208. *J. Infect. Dis.* 190:1745-54. Erratum in: *J. Infect. Dis.* (2005) 191:2161.

Kotloff, K. L.; Winickoff, J. P.; Ivanoff, B.; Clemens, J. D.; Swedlow, D. L.; Sansonetti, P. J.; Adak, G. K.; Levine, M. M. (1999) Global burden of *Shigella* infections:

implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull. World Health Organ. 77: 651.

Kueltzo, L. A.; Osiecki, J.; Barker, J.; Picking, W. L.; Ersoy, B.; Picking, W. D.; Middaugh, C. R. (2003) Structure–function analysis of Invasion Plasmid Antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri*. J. Biol. Chem. 278: 2792–2798.

Kuipers, O. P.; Beerthuyzen, M. M.; Siezen, R. J.; De Vos, W. M. (1993) Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. Eur. J. Biochem. 216: 281–291.

Kuipers, O. P.; de Ruyter, P. G.; Kleerebezem, M.; de Vos, W.M. (1997) Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. Trends Biotechnol. 15: 135–140.

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

Levine, M. M.; Kotloff, K.L.; Barry, E.M.; Pasetti, M.F.; Sztein, M.B. (2007) Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. Nat. Rev. Microbiol. 5: 540-53.

Li, A.; Rong, Z. C.; Ekwall, E.; Forsum, U.; Lindberg, A. A. (1993) Serum antibody responses against *Shigella* lipopolysaccharides and invasion plasmid-coded antigens in *Shigella* infected Swedish patients. Scand. J. Infect. Dis. 25: 569–577.

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

Li, A.; Zhao, C. R.; Ekwall, E.; Lindberg, A. A. (1994). Serum IgG antibody responses to *Shigella* invasion plasmid-coded antigens detected by immunoblot. Scand. J. Infect. Dis. 26: 435–445.

Lima, A. A. M.; Lima, N.L.; Pinho, M.C.N.; Barros Junior, E. A.; Teixeira, M. J.; Martins, M. C. V.; Guerrant, R. L. (1995) High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 256-259.

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

Marquart, M. E.; Picking, W. L.; Picking, W. D. (1996) Soluble invasion plasmid antigen C (IpaC) from *Shigella flexneri* elicits epithelial cell responses related to pathogen invasion. Infect. Immun. 64: 4182-4187.

- Martinez-Becerra, F. J.; Kissmann, J. M.; Diaz-McNair, J.; Choudhari, S. P.; Quick, A. M.; Mellado-Sanchez, G.; Clements, J. D.; Pasetti, M. F.; Picking, W. L. (2012) Broadly protective *Shigella* vaccine based on type III secretion apparatus proteins. *Infect. Immun.* 80: 1222-31.
- Medeiros, M. I.; Neme, S. N.; da Silva, P.; Capuano, D. M.; Errera, M. C.; Fernandes, S. A.; do Valle, G. R.; de Avila, F. A. (2001) Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Rev. Ins. Med. Trop. Sao Paulo.* 43: 21-4.
- Menard, R.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. (1993) Non-polar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC and IpaD as effectors of *Shigella* entry into epithelial cells. *J. Bacteriol.* 175: 5899–5906.
- Menard, R.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. (1994a) The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasions is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J.* 13: 5293–5302.
- Menard, R., Sansonetti, P. J.; Parsot, C.; Vasselon, T. (1994b) Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *Shigella flexneri*. *Cell.* 79: 515–525.
- Merino, L. A.; Hrenuk, G. E.; Ronconi, M. C.; Alonso, J. M. (2004) Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Shigella* spp. in northeastern Argentina. *Rev. Panam. Salud Publica.* 15: 219-224.
- Miyoshi, A.; Jamet, E.; Commissaire, J.; Renault, P.; Langella, P.; Azevedo, V. (2004) A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* 239: 205-12.
- Moss, J. E.; Cardozo, T. J.; Zychlinsky, A.; Groisman, E. A. (1999) The SelC- associated SHI-2 pathogenicity island of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 33: 74–83.
- Muthumani, K.; Lankaraman, K. M.; Laddy, D. J.; Sundaram, S. G., Chung, C. W.; Sako, E.; Wu, L.; Khan, A.; Sardesai, N.; Kim, J. J.; Vijayachari, P.; Weiner, D. B. (2008) Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine.* 26: 5128-34.
- Nelson, M. R.; Shanson, D. C.; Hawkins, D. A.; Gazzard, B. G. (1992) *Salmonella*, *Campylobacter* and *Shigella* in HIVseropositive patients. *AIDS.* 6: 1495–1498.
- Neutra, M. R.; Pringault, E.; Kraehenbuhl, J. P. (1996) Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 275-300.
- Norton, P. M.; Le Page, R. W.; Wells, J. M. (1995) Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiol.* 40: 225-30.

Nouaille, S.; Ribeiro, L. A.; Miyoshi, A.; Pontes, D.; Le Loir, Y.; Oliveira, S. C.; Langella, P.; Azevedo, V. (2003) Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet. Mol. Res* 2: 102–111.

Nutten, A.; Sansonetti, P. J.; Huet, G.; Bourdon-Bisiaux, C.; Meresse, B.; Colombel, J.; Desreumaux, P. (2002) Epithelial inflammation response induced by *Shigella flexneri* depends on mucin gene expression. *Microbes Infect.* 4: 1121–1124.

Oaks, E. V.; Hale, T. L.; Formal, S. B. (1986) Serum immune response to *Shigella* protein antigens in rhesus monkeys and humans infected with *Shigella* spp. *Infect. Immun.* 53: 57–63.

Oaks, E. V. and Turbyfill, K. R. (2006) Development and evaluation of a *Shigella flexneri* 2a and *S. sonnei* bivalent invasin complex (Invaplex) vaccine. *Vaccine.* 24: 2290–2301.

Oberhelman, R. A.; Kopecko, D. J.; Salazar-Lindo, E.; Gotuzzo, E.; Buysse, J. M.; Venkatesan, M. M.; Fernandez-Prada, C.; Guzman, M.; Leon-Barua, R. (1991) Prospective study of systemic and mucosal immune responses in dysenteric patients to specific *Shigella* invasion plasmid antigens and lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 59: 2341–2350.

Orlandi, P. P.; Magalhães, G. F.; Matos, N. B.; Silva, T.; Penatti, M.; Nogueira, P. A.; Pereira da Silva, L. H. (2006) Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondônia, Western Amazon Region, Brazil). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39: 507-517.

Page, A. L.; Sansonetti, P. J.; Parsot, C. (2002) Spa15 of *Shigella flexneri*, a third type of chaperone in the type III secretion pathway. *Mol. Microbiol.* 43: 1533–1542.

Peirano, G.; Souza, F.S.; Rodrigues, D.P.; *Shigella* Study Group. (2006) Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella* spp. from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101: 245-50.

Perdomo, J. J.; Gounon, P.; Sansonetti, P. J. (1994) Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by *Shigella flexneri*. *J. Clin. Invest.* 93: 633–643.

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

Pickering, L. K. (2004) Antimicrobial resistance among enteric pathogens. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 15:71-7.

Picking, W. L.; Coye, L.; Osiecki, J. C.; Barnoski Serfis, A.; Schaper, E.; Picking, W. D. (2001) Identification of functional regions within invasion plasmid antigen C (IpaC) of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 39: 100–111.

Picking, W. L.; Mertz, J. A.; Marquart, M. E.; Picking, W. D. (1996) Cloning, expression, and affinity purification of recombinant *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens IpaB and IpaC. *Protein Expression Purif.* 8: 401-408.

Rajakumar, K.; Sasakawa, C.; Adler, B. (1997) Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. *Infect. Immun.* 65: 4606–4614.

Raqib, R.; Lindberg, A. A.; Wretling, B.; Bardhan, P. K.; Andersson, U.; Andersson, J. (1995) Persistence of local cytokine production in shigellosis in acute and convalescent stages. *Infect. Immun.* 63: 289–296.

Raqib, R.; Qadri, F.; Sarker, P.; Mia, S. M.; Sansonetti, P. J.; Albert, M. J.; Andersson, J. (2002) Delayed and reduced adaptive humoral immune responses in children with shigellosis compared with in adults. *Scand. J. Immunol.* 55: 414–423.

Rare Codon Calculator (RaCC) – UCLA. Disponível em: <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>. Acesso em 20 de out. 2010.

Robinson, K.; Chamberlain, L. M.; Lopez, M. C.; Rush, C. M.; Marcotte, H.; Le Page, R. W.; Wells, J. M. (2004) Mucosal and cellular immune responses elicited by recombinant *Lactococcus lactis* strains expressing tetanus toxin fragment C. *Infect. Immun.* 72: 2753–2761.

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

Rudolph, R. and Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10: 49-66.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp. 1584.

Sansonetti, P. J.; Arondel, J.; Cavaillon, J. M.; Huerre, M. (1995) Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis. *J. Clin. Invest.* 96: 884–892.

Sansonetti, P. J. and Phalipon, A. (1999) M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin. Immunol.* 11: 193–203.

Santos, B. A.; Pires, A. A.; Souza, A. R. M.; Vives, C.; Barcellos, S.; Bo, D. J. D. (1997) Study of *in vitro* antimicrobial resistance of positive coprocultures to *Shigella* sp. *J. Pediatr.* 73: 395-400.

Schotte, L.; Steidler, L.; Vandekerckhove, J.; Remaut, E. (2000) Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 761-765.

Schroeder, G. N. and Hilbi, H. (2008) Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 134-56. Review.

Simmons, D. A. and Romanowska, E. (1987) Structure and biology of *Shigella flexneri* O antigens. *J. Med. Microbiol. Rev.* 23: 289-302.

Souza, F.S. (2001) Study of Characteristics Phenotypics and Genotypics in *Shigella flexneri*. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 104 pp.

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

Tailliez, P. (2001) Mini-revue: les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait* 81: 1-11.

Thiem, V. D.; Sethabutr, O.; Von Seidlein, L.; Tran, V. T.; Do, G. C.; Bui, T. C.; Le, H. T.; Lee, H.; Houg, H. S.; Hale, T. L.; Clemens, J. D.; Mason, C.; Dang, D. T. (2004) Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the ipaH gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2031-5.

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

Tran Van Nhieu, G.; Caron, E.; Hall, A.; Sansonetti, P. J. (1999) IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J.* 18: 3249-3262.

Tran, N.; Serfis, A. B.; Osiecki, J. C.; Picking, W. L.; Coye, L.; Davis, R.; Picking, W. D. (2000) Interaction of *Shigella flexneri* IpaC with model membranes correlates with effects on cultured cells. *Infect. Immun.* 68: 3710-3715.

Turbyfill, K. R.; Hartman, A. B.; Oaks, E. V. (2000) Isolation and characterization of a *Shigella flexneri* invasion complex subunit vaccine. *Infect. Immun.* 68: 6624-6632.

Turbyfill, K. R.; Joseph, S. W.; Oaks, E. V. (1995) Recognition of three epitopic regions on invasion plasmid antigen C by immune sera of rhesus monkeys infected with *Shigella flexneri* 2a. *Infect Immun.* 63: 3927-35.

Turner, S. A.; Luck, S. N.; Sakellaris, H.; Rajakumar, K.; Adler, B. (2001) Nested deletions of the SRL pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a. *J. Bacteriol.* 183: 5535-5543.

van Asseldonk, M.; Rutten, G.; Oteman, M.; Siezen, R. J.; de Vos, W. M. and Simons, G. (1990) Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of usp45, a gene encoding a highly secreted protein from *Lactococcus lactis* MG1363. *Gene.* 95: 155-160.

- van de Guchte, M.; Ehrlich, S. D.; Maguin, E. (2001) Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. J. Appl. Microbiol. 91: 147–153.
- van de Verg, L. L.; Herrington, D. A.; Boslego, J.; Lindberg, A. A.; Levine, M. M. (1992) Age-specific prevalence of serum antibodies to the invasion plasmid and lipopolysaccharide antigens of *Shigella* species in Chilean and North American populations. J. Infect. Dis. 166: 158–161.
- van de Verg, L. L.; Mallet, C. P.; Collins, H. H.; Larsen, T.; Hammack, C.; Hale, T. L. (1995) Antibody and cytokine responses in a mouse pulmonary model of *Shigella flexneri* serotype 2a infection. Infect. Immun. 63: 1947–1954.
- Walker, J. C. and Verma, N. K. (2002) Identification of a putative pathogenicity island in *Shigella flexneri* using subtractive hybridisation of the *S. flexneri* and *Escherichia coli* genomes. FEMS Microbiol. Lett. 10580: 1–8.
- Wassef, J. S.; Keren, D. F.; Mailloux, J. L. (1989) Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis. Infect. Immun. 57: 858–863.
- Wei, J.; Goldberg, M. B.; Burland, V.; Venkatesan, M. M.; Deng, W.; Fournier, G.; Mayhew, G.; Plunkett III, G.; Rose, D.; Darling, A.; Mau, B.; Perna, N. T.; Payne, S. M.; Runyen-Janecky, L.; Zhou, S.; Schwartz, D. C.; Blattner, F. R. (2003) Complete genomic sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. Infect. Immun. 71: 2775–2786.
- Wells, J. M. and Mercenier, A. (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 6: 349-362.
- Xin, K.Q.; Hoshino, Y.; Toda, Y.; Igimi, S.; Kojima, Y.; Jounai, N.; Ohba, K.; Kushiro, A.; Kiwaki, M.; Hamajima, K.; Klinman, D.; Okuda, K. (2003) Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV. Env. Blood 102: 223–228.
- Zychlinsky, A.; Prevost, M. C.; Sansonetti, P. J. (1992) *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. Nature. 358: 167–169.
- Zwillich, S. H.; Duby, A. D.; Lipsky, P. E. (1989) T-lymphocyte clones responsive to *Shigella flexneri*. J.Clin.Microbiol. 27: 417–421.