

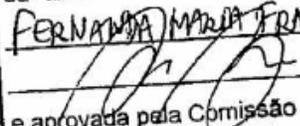


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO E BIOAGENTES

Fernanda Maria Franzin

**CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DA IMUNOGENICIDADE DE UMA LINHAGEM
ATENUADA DE *Salmonella enterica* PRODUTORA DO DOMÍNIO M2 DO
ANTÍGENO MAEBL DE *Plasmodium yoelii*.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular; Área de Concentração:
Genética de Microrganismos

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
FERNANDA MARIA FRANZIN

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientador Prof. Dr. Marcelo Brocchi
Co-orientador: Prof. Dr. Fabio T M Costa

Campinas

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F859c

Franzin, Fernanda Maria

Construção e análise da imunogenicidade de uma linhagem atenuada de *Salmonella enterica* produtora do domínio M2 do antígeno MAEBL de *Plasmodium yoelii* / Fernanda Maria Franzin. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Marcelo Brocchi, Fabio Trindade Maranhão Costa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Salmonella enterica*. 2. Vacina recombinante. 3. Malária. 4. Antígeno MAEBL. 5. *Plasmodium yoelii*. I. Brocchi, Marcelo, 1967-. II. Costa, Fabio Trindade Maranhão, 1972-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Construction and analysis of the immunogenicity of an attenuated strain of *Salmonella enterica* expressing MAEBL antigen M2 domain of *Plasmodium yoelii*.

Palavras-chave em inglês: *Salmonella enterica*; Recombinant vaccine, DNA; Malaria; MAEBL antigen; *Plasmodium yoelii*.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Marcelo Brocchi, Marcelo Palma Sircili, Euclides Matheucci Júnior.

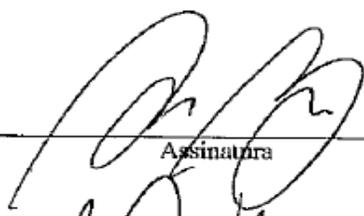
Data da defesa: 01/07/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 01 de Julho de 2009.

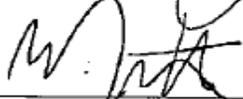
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Brocchi (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Euclides Matheucci Júnior



Assinatura

Prof Dr. Marcelo Palma Sircili



Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Maria Cristina Roque-Barreira

Assinatura

Prof(a). Dr(a) Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada "Construção e análise da imunogenicidade de uma linhagem atenuada de *Salmonella enterica* produtora do domínio M2 do antígeno MAEBL de *Plasmodium yoelii*"

não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** ()

tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº1674-1, Novembro 2008);

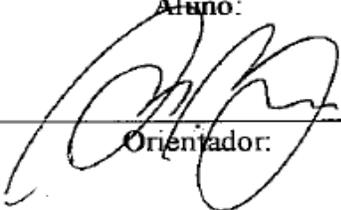
tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.

- Especificar: _____

Suzana M. Franzin

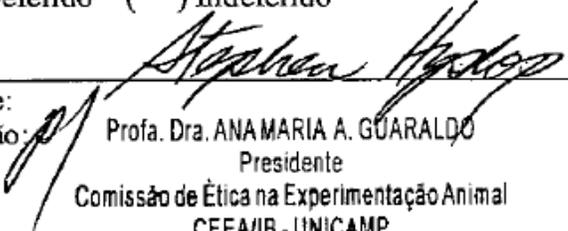
Aluno:


Orientador:

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido Indeferido

Nome:

Função:  Prof. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/IB - UNICAMP

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular Bacteriana, no Departamento de Genética e Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da UNICAMP e contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil
- e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos. "
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS.

Agradeço acima de tudo a Deus, pela vida, pela família, pela saúde, pelo amor, pelo saber.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo, pela confiança depositada, pela amizade, respeito, e ensinamentos tão valiosos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fabio Costa, pela disposição e constante colaboração.

Aos professores Dr. Euclides Matheucci Júnior e Dr. Marcelo Palma Sircili, pela participação na banca examinadora e pelas sugestões na correção da proforma dessa dissertação.

Aos meus tios e tias, por toda a ajuda, amor e carinho.

Aos meus primos Maurício, Aline e Amanda, pela amizade, companheirismo e risadas nas tardes de domingo. Sinto falta de vocês!

Ao meu noivo Guilherme por todo o amor, carinho, dedicação, companheirismo, confiança, por toda a ajuda nos momentos difíceis, no dia-a-dia do laboratório, por todo o conhecimento compartilhado. Pelo seu exemplo de força e hombridade. Este trabalho é uma conquista nossa. Obrigada por fazer parte da minha vida. Te amo!

Às colegas do laboratório do Prof. Fabio, Ju, Stef, Yara e Bruna por toda a ajuda e materiais emprestados. À Ju, principalmente, pela doação da proteína purificada e ajuda nos experimentos de desafio e parasitemia.

Aos amigos de laboratório André, Bela, Dããã, Dorival, Du, Gui, Gerson, Lu Hollanda e Lu Chimetto, por toda ajuda e por fazerem os dias de trabalho mais agradáveis com tantas risadas!

Ao modelo experimental utilizado, muito importante para a evolução do conhecimento científico e cujas vidas inocentemente foram alvo deste estudo.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Você pode dizer adeus a sua família e a seus amigos e afastar-se milhas e milhas e, ao mesmo tempo, carregá-los em seu coração, em sua mente, em seu estômago, pois você não apenas vive no mundo, mas o mundo vive em você”.

(Frederick Buechner, Telling The Truth)

ÍNDICE.

LISTA DE ABREVIACÕES

RESUMO

ABSTRACT

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Malária | 1 |
| 1.1.1. A malária no contexto mundial | 1 |
| 1.1.2. Características gerais da doença | 3 |
| 1.1.3. Malária e vacinas | 5 |
| 1.1.4. O antígeno MAEBL | 9 |
| 1.2. <i>Salmonella</i> | 12 |
| 1.2.1. Vacinas recombinantes | 12 |
| 1.2.2. <i>Salmonella</i> e vacinas recombinantes | 13 |
| 1.2.3. Mutações que atenuam a virulência | 16 |
| 1.2.4. Expressão de antígenos em linhagens vacinais de <i>S. enterica</i> | 17 |
| 1.2.5. <i>Salmonella</i> em vacinas recombinantes contra <i>Plasmodium</i> | 19 |
| 2. OBJETIVOS | 22 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 3.1. Linhagens Bacterianas | 23 |
| 3.2. Plasmídios | 24 |
| 3.3. Meios de cultura e condições de cultivo bacteriano | 25 |
| 3.4. Animais | 25 |
| 3.5. Construção dos vetores e linhagens | 26 |
| 3.5.1. Seleção dos iniciadores para a amplificação do domínio M2 do gene <i>maeb1</i> de <i>Plasmodium yoelii</i> | 26 |
| 3.5.2. Amplificação do gene <i>maeb1</i> por PCR | 26 |

| | |
|---|----|
| 3.5.3. Eletroforese em gel de agarose | 27 |
| 3.5.4. Purificação do fragmento <i>m2</i> do gene <i>maebl</i> em gel de agarose | 28 |
| 3.5.5. Clonagem de <i>m2</i> no plasmídeo pGEM-T | 28 |
| 3.5.6. Preparação de células bacterianas competentes para transformação por choque térmico | 28 |
| 3.5.7. Transformação bacteriana por choque térmico | 29 |
| 3.5.8. Extração dos plasmídios pGEM-T <i>m2</i> , pYA3137 e pYA3137 <i>trcm2</i> por lise alcalina em pequena escala (mini-prep) | 30 |
| 3.5.9. Purificação de plasmídios | 31 |
| 3.5.10. Sequenciamento de DNA | 31 |
| 3.5.11. Clonagem de <i>m2</i> em pYA3137 <i>trc</i> e transformação em <i>E.coli</i> χ 6212 | 32 |
| 3.5.12. Preparação de células competentes para eletroporação | 33 |
| 3.5.13. Transformação por eletroporação de células de <i>S. enterica</i> Typhimurium χ 3987 com os vetores pYA3137 e pYA3137 <i>trcm2</i> | 33 |
| 3.5.14. Preparação do bacteriófago P22HT para transdução | 34 |
| 3.5.15. Determinação do título do bacteriófago P22HT | 34 |
| 3.5.16. Transferência de plasmídeos pYA3137 e pYA3137 <i>trcm2</i> para <i>S. enterica</i> Typhimurium por transdução generalizada com o bacteriófago P22HT | 35 |
| 3.6. Caracterização das linhagens vacinais | 37 |
| 3.6.1. Sorologia para <i>Salmonella</i> | 37 |
| 3.6.2. Teste fenotípico para as mutações Δ <i>cya</i> Δ <i>crp</i> e Δ <i>aroA</i> Δ <i>aroD</i> | 37 |
| 3.7. Análise da expressão de <i>m2</i> em linhagens de <i>S. enterica</i> Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683 | 38 |
| 3.7.1. Extração de proteínas totais | 38 |
| 3.7.2. Análise eletroforética do perfil protéico de <i>S. enterica</i> Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683 recombinantes | 39 |
| 3.7.3. Detecção de M2 por <i>immunoblott</i> | 39 |

| | |
|---|----|
| 3.8. Curva de Crescimento <i>in-vitro</i> das linhagens de <i>S. enterica</i> Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683 recombinantes | 40 |
| 3.9. Cultivo e preparo de células de <i>S. enterica</i> Typhimurium χ 4550 e H683 para inoculação em camundongos BALB/c/AnUnib/AnUnib | 41 |
| 3.10. Experimentos <i>in vivo</i> | 42 |
| 3.10.1. Estabilidade das linhagens recombinantes vacinais de <i>S. enterica</i> Typhimurium <i>in vivo</i> : persistência nos órgãos de camundongos BALB/c/AnUnib | 42 |
| 3.10.2. Imunização oral de camundongos BALB/c/AnUnib com a linhagem recombinante vacinal de <i>S. enterica</i> Typhimurium H683 | 43 |
| 3.11. Análise da resposta imune induzida | 43 |
| 3.11.1. Coleta e processamento do soro de camundongos BALB/c/AnUnib imunizados | 43 |
| 3.11.2. Coleta e processamento de material fecal de camundongos BALB/c/AnUnib imunizados | 44 |
| 3.11.3. Preparação de antígenos de <i>S. enterica</i> Typhimurium H683 para ELISA | 45 |
| 3.11.4. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) | 45 |
| 3.11.4.1. Detecção da IgG sérica anti-M2 e anti <i>Salmonella</i> | 45 |
| 3.11.4.2. Detecção da IgA de mucosa anti M2 e anti <i>Salmonella</i> | 46 |
| 3.11.5. Determinação do título de anticorpos | 47 |
| 3.11.6. Desafio de animais imunizados frente à infecção por <i>Plasmodium yoelii</i> e análise da evolução da parasitemia | 47 |
| 3.12. Análises estatísticas | 48 |
| 4. RESULTADOS | 49 |
| 4.1. Construção dos vetores e linhagens | 49 |
| 4.1.1. Amplificação e clonagem do domínio M2 do gene <i>maebl</i> de <i>Plasmodium yoelii</i> | 49 |
| 4.1.2. Transformação de <i>S. enterica</i> Typhimurium com pYA3137trcm2 | 55 |
| 4.2. Caracterização das linhagens vacinais: sorologia para <i>Salmonella</i> e teste fenotípico para as mutações Δ <i>cydA</i> Δ <i>crp</i> e Δ <i>aroA</i> Δ <i>aroD</i> | 56 |

| | |
|---|-----|
| 4.3. Avaliação da expressão de M2 nas linhagens de <i>S. enterica</i> Typhimurium | 57 |
| 4.4. Curva de Crescimento <i>in vitro</i> | 59 |
| 4.5. Persistência das linhagens vacinais de <i>S. enterica</i> Typhimurium | 61 |
| 4.6. Imunização de camundongos BALB/c/AnUnib | 63 |
| 4.6.1. Análise do título de anticorpos IgG sérico e IgA de mucosa | 63 |
| 4.7. Desafio e análise da evolução da parasitemia | 66 |
| | |
| 5. DISCUSSÃO | 69 |
| 6. CONCLUSÃO | 82 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
| 8. ANEXO | 103 |

LISTA DE ABREVIÇÕES.

| | |
|----------------------------------|---|
| ANOVA | Análise de Variância |
| <i>aroA</i> | Gene Via de Aminoácidos Aromáticos |
| <i>aroD</i> | Gene da Via de Aminoácidos Aromáticos |
| <i>asd</i> | Gene Codificante para a Aspartato Semialdeído Desidrogenase |
| BS | Salina Tamponada |
| BSA | Soro Albumina Bovina |
| CaCl ₂ | Cloreto de Cálcio |
| <i>crp</i> | Gene Codificante para o Receptor de cAMP |
| <i>cya</i> | Gene Codificante para a Adenilato Ciclase |
| DAP | Ácido Diaminopimélico |
| DBL | Proteínas <i>Duffy Binding Like</i> |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeos Fosfatados |
| DO | Densidade Ótica |
| DTT | Dithiothreitol |
| EBP | Proteínas de Ligação ao Eritrócito |
| <i>E coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| ELISA | Imunoensaio Enzimático |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| <i>H. pylori</i> | <i>Helicobacter pylori</i> |
| H ₂ SO ₄ | Ácido Sulfúrico |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgG | Imunoglobulina G |
| Kb | Kilobase |
| KDa | Kilodaltons |
| KH ₂ PO ₄ | Fosfato de Potássio Desidrogenado |
| LA | Luria Bertani Ágar |
| LB | Luria Bertani |
| LBEDO | Meio LB modificado com E-sais e glicose |
| M | Molar |
| MAEBL | Antígeno de Membrana Similar ao Ligante de Eritrócito |
| MgCl ₂ | Cloreto de Magnésio |
| mL | Mililitro |
| mM | Mili molar |
| N | Normal |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| Na ₂ HPO ₄ | Fosfato de Sódio Monohidrogenado |
| NaH ₂ PO ₄ | Fosfato de Sódio Diidrogenado |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| <i>napA</i> | Gene da Proteína Ativadora de Neutrófilos de <i>H. pylori</i> |
| ng | Nanograma |
| OPD | 1,2 ortofenilenodiamino |
| <i>oriR</i> | Origem de Replicação |

| | |
|---------------------|--|
| pb | Pares de base |
| PBS | Tampão Salina Fosfato |
| <i>P berghei</i> | <i>Plasmodium berghei</i> |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| <i>P falciparum</i> | <i>Plasmodium falciparum</i> |
| <i>pfama1</i> | Antígeno Apical de Membrana 1 de <i>Plasmodium falciparum</i> |
| pfu | Unidades Formadoras de Placa |
| PMSF | Fluoreto de Fenilmetilsulfonil |
| <i>P yoelii</i> | <i>Plasmodium yoelii</i> |
| P22HT | Bacteriófago P22 de Alta Frequência de Transdução |
| r-PfM2 | Domínio M2 recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i> |
| rpm | Rotações por Minuto |
| <i>S. enterica</i> | <i>Salmonella enterica</i> |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS |
| spp | Espécie |
| TBE | Tris Borato EDTA |
| <i>trc</i> | Promotor Híbrido <i>trc</i> (<i>trp</i> e <i>lac</i>) |
| TSBA | Ágar Caldo de Triptona semi-sólido |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| U.V | Ultra Violeta |
| V | Volts |
| v/v | Volume/Volume |
| vapA | Gene da Proteína Associada á Virulência de <i>Rhodococcus equi</i> |
| WHO | World Health Organization |
| Δ | Deleção |
| μg | Micrograma |
| μL | Microlitro |

RESUMO.

A malária é uma doença tropical causada pelo parasita *Plasmodium* spp e é considerada um sério problema de saúde pública. São aproximadamente 500 milhões de casos anuais e mais de um milhão de mortes, especialmente na África e Ásia. No Brasil, são 500 mil novos casos por ano, principalmente na região Amazônica.

Esses elevados índices de mortalidade e morbidade são motivadores da busca por estratégias de controle e eliminação dessa doença. A vacinação é uma ferramenta promissora no controle e prevenção da malária, entretanto, uma vacina segura e efetiva ainda não está disponível, em parte devido ao complexo ciclo de vida do parasita e a expressão de diferentes antígenos em cada fase. O antígeno de membrana similar ao ligante de eritrócitos (MAEBL), é um forte candidato a ser usado no desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a malária, uma vez que esse antígeno é expresso em diferentes períodos do ciclo de vida do parasita.

Neste estudo, o domínio M2 do antígeno MAEBL de *Plasmodium yoelli* foi expresso em linhagens vivas atenuadas de *Salmonella enterica* Typhimurium (χ 3987, χ 4550 e H683) e o uso dessas bactérias como vacina recombinante potencialmente indutora de proteção contra malária murina foi avaliado. Essas linhagens foram obtidas após construção e transdução do plasmídeo pYA3137trc contendo a região *m2* do gene *maebl* e a expressão do antígeno foi confirmada por *immunoblotting*. A administração oral das linhagens recombinantes a camundongos BALB/c/AnUnib resultou na colonização dos tecidos hospedeiros apenas pela linhagem H683. Essa linhagem foi então avaliada em termos de indução de resposta imune humoral contra M2 e capacidade de imunização no modelo murino. Apesar da resposta humoral contra M2 ter sido detectada *in vivo*, a linhagem recombinante não demonstrou proteção potencial contra a infecção por *Plasmodium yoelii* no modelo murino.

ABSTRACT.

Malaria is a tropical disease caused by the parasite *Plasmodium* spp and is considered a serious public health problem. There are about 500 million annual cases and more than one million of deaths, especially in Africa and Asia. In Brazil, there are 500.000 new cases per year, mainly in the Amazon region.

Those high rates mortality motivate the search for strategies of control and elimination of this illness. The vaccination is a promising tool in the control and prevention of malaria; however, a safe and effective vaccine is not available yet, in part due to the complex life cycle of the parasite and expression of different antigens in each phase. Membrane antigen erythrocyte binding like (MAEBL) is a strong candidate to be used in the development of an effective vaccine against malaria, since this antigen is expressed in different periods of the parasite life cycle.

In this work, the M2 domain of *Plasmodium yoelli* MAEBL antigen was expressed in attenuated strains of *Salmonella enterica* Typhimurium (χ 3987, χ 4550 e H683) and the use of these bacterias as potential inductor of protection against murine malaria was evaluated. These strains were obtained by construction and transduction of the plasmid pYA3137m2 region of the *maebl* gene and the antigen expression was confirmed by *immunoblotting*. The oral administration of the recombinant strains to BALB/c/AnUnib mice resulted in the colonization of host tissues only for the H683 strain. This strain was further evaluated in terms of induction of humoral immune response against M2 and immunization capacity in murine model. Even though humoral response against M2 was detected *in vivo*, the recombinant strains did not shown protective potential against the infection of *Plasmodium yoelii* in murine model.

1 - INTRODUÇÃO.

1.1. Malária.

1.1.1. A malária no contexto mundial.

A malária é a doença parasitária mais importante e uma das doenças infecciosas mais prevalentes do mundo. Ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, com 109 países classificados como endêmicos ou previamente endêmicos com risco de reintrodução (WHO, 2006). A malária é responsável por aproximadamente 500 milhões de novos casos anuais ocasionando mais de um milhão de mortes. O continente africano, contudo, detém 90% da mortalidade mundial, na sua maioria crianças e gestantes que vivem na África sub-Sahariana, seguida pelo sudeste da Ásia, com 4% (WHO, 2000). Segundo estimativas da *World Health Organization*, aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas (50% da população mundial) vivem em áreas com algum risco de transmissão da malária e embora a grande maioria das mortes causadas pela malária ocorra na África, a doença encontra-se amplamente distribuída na América Latina, Sudeste Asiático e Oceania.

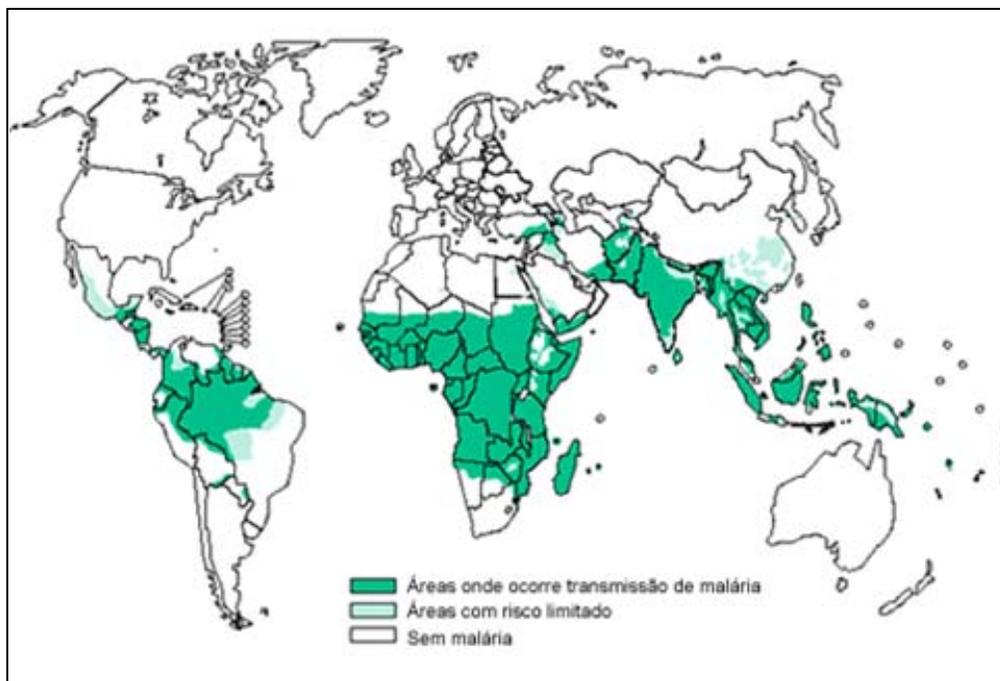


Figura 1: Mapa demonstrando a distribuição geográfica da ocorrência da malária no mundo.
 Fonte: OMS, 2004.

No Brasil, mais de 60% do território apresenta condições favoráveis à incidência de malária, porém, cerca de 95% dos casos do país ocorrem na Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), onde são registrados aproximadamente 500 mil novos casos por ano (Freitas *et al.*, 2007). Nos estados fora da região Amazônica, o risco de transmissão local é pequeno ou inexistente e a quase totalidade dos casos registrados é importada da Amazônia legal ou de outros países.

Esses elevados índices de mortalidade e morbidade causados pela malária interferem de maneira significativa no desenvolvimento sócio-econômico e perpetuam um ciclo de pobreza e subdesenvolvimento nos países mais atingidos (WHO, 2008). Por isso, durante décadas a malária vem sendo alvo de intensas campanhas com o objetivo de erradicar a transmissão do parasita por meio de inseticidas e quimioterapia, mas, devido à falta de uma

vacina eficiente e ao aumento da resistência de parasitas e dos mosquitos vetores, respectivamente, às drogas e inseticidas convencionalmente utilizados, a malária tem reaparecido em diversas regiões do mundo. Segundo Moorthy *et al.* (2004), nos últimos anos, além do aparecimento de novas áreas de transmissão, o número de casos de malária e a mortalidade associada vêm aumentando nos países endêmicos, devido à precariedade das condições sócio-ambientais, principalmente nas regiões rurais. Além disso, os movimentos migratórios nos países afetados contribuem para o reaparecimento de epidemias em áreas onde a malária já tinha sido erradicada.

1.1.2. Características gerais da doença.

A malária é transmitida pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas e causada por parasitas eucarióticos unicelulares do gênero *Plasmodium*. Este gênero, que pertence ao filo Apicomplexa onde se inclui patógenos intracelulares como *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Eimeria* e *Babesia* (revisado por Garcia *et al.*, 2006), possui mais de 100 espécies, sendo que quatro delas, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, causam a doença em humanos. *P. falciparum* é a espécie responsável por 91% das mortes por malária (WHO, 2008), seguida por *P. vivax*.

A infecção malárica em humanos inicia-se pela inoculação de alguns esporozoítos no tecido subcutâneo através da picada do mosquito. Os esporozoítos atingem a circulação sanguínea e invadem os hepatócitos (Mota *et al.*, 2002, Mota & Rodrigues, 2004). Neste estágio, o *Plasmodium* apresenta antígenos específicos que medeiam a entrada do parasita nos hepatócitos, como a proteína do circumsporozoíta (CSP) e a proteína adesiva

relacionada a trombospondina (TRAP) (Silvie *et al.*, 2003). No interior dos hepatócitos, os parasitas se desenvolvem em merozoítos. Os merozoítos são liberados pelos hepatócitos na corrente sanguínea e invadem as hemácias iniciando o estágio sanguíneo. A invasão dos eritrócitos pelo parasita envolve diferentes mecanismos, onde várias moléculas de superfície de *Plasmodium*, como a proteína de ligação ao eritrócito (EBA-175), o antígeno apical de membrana (AMA-1) e a proteína de superfície do merozoíto (MSP) se ligam a diversos receptores na superfície da hemácia. Dentro do eritrócito, cada merozoíto se desenvolve em trofozoíto, que gera um esquizonte, que após completa maturação gera mais de 32 merozoítos. Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea onde infectam outras hemácias, mantendo o ciclo. Esses repetitivos ciclos de invasão e replicação são os responsáveis pelos sintomas clínicos da doença (Collins *et al.*, 2009). Alguns merozoítos se desenvolvem em gametócitos masculinos e femininos e são adquiridos pelo mosquito quando este se alimenta do sangue humano. No intestino do mosquito, ocorre a fertilização dos gametócitos femininos e a geração dos esporozoítos. Os esporozoítos alcançam a glândula salivar onde maturam e completam o ciclo de vida do parasita, estando prontos para nova infecção no hospedeiro humano (Carvalho *et al.*, 2002).

Sintomas da malária incluem febre de início súbito, elevada (acima de 40°C) e intermitente, calafrios, dores de cabeça, perda do apetite, mal-estar geral. O período de incubação pode variar de nove a quarenta dias e os sintomas são mais graves nos indivíduos primo-infectados. Sob certas circunstâncias, a infecção por *Plasmodium* pode causar anemia severa ou malária cerebral (Miller *et al.*, 1994).

O diagnóstico é feito através da detecção de *Plasmodium* no sangue periférico, por esfregaço ou gota espessa utilizando-se microscópio e coloração por Giemsa e o tratamento

inclui drogas antimaláricas como a cloroquina e primaquina. Mas devido a resistência do parasita um grande número de medicamentos utilizados no tratamento da malária, a *World Health Organization* recomenda o uso de terapias combinadas, preferencialmente aquelas contendo derivados de artemisinina (ACT) para a malária causada por *Plasmodium falciparum* (Majori *et al.*, 2004).

De acordo com a WHO, o controle da disseminação da malária inclui intervenções como o tratamento imediato e efetivo e o uso de inseticidas e redes para populações vivendo em áreas de risco. Mas é claro que, apesar do sucesso obtido pelo uso das ferramentas existentes, estratégias adicionais ou alternativas são necessárias para que a eliminação da malária seja alcançada. Neste sentido, o desenvolvimento de uma vacina e a identificação de novos alvos no parasita para intervenções quimioterapêuticas são medidas de extrema importância (Collins *et al.*, 2009).

1.1.3. Malária e vacinas.

O desenvolvimento de uma vacina contra a malária poderia prover um novo mecanismo para o controle desta doença (Gómez-Duarte *et al.*, 2001), mas apesar de uma constante atividade de pesquisa, ainda não existem vacinas capazes de impedir de maneira eficaz e duradoura a infecção pelo *Plasmodium* spp.

Análises experimentais sugerem que a indução de imunidade protetora contra malária pode ser um objetivo tangível, principalmente pela observação de que imunizações com formas esporozoítas irradiadas foram capazes de induzir proteção parcial e total em camundongos (Nusseenzweig *et al.*, 1967), em primatas não-humanos (Collins & Contacos, 1972) e em humanos (Rieckmann *et al.*, 1979); indivíduos infectados continuamente pelo

parasita desenvolvem gradualmente uma imunidade natural, porém de curta duração e cepa-específica (Baird *et al.*, 1991); e que a transferência passiva do soro de pacientes “ímmunes” induz proteção em crianças infectadas (Sabchaeron *et al.*, 1991). Estas evidências abrem perspectivas para o desenvolvimento de uma vacina contra malária, em particular, pela utilização de esporozoítas atenuados por irradiação.

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

Por essas razões, a limitação fundamental do desafio de desenvolver uma vacina contra malária é a identificação de antígenos que sejam não apenas imunogênicos, mas principalmente protetores (Matuschewski & Mueller, 2007). Para isso, é necessário (i) identificar proteínas que sejam relevantes na infecção e que induzam uma resposta imune efetiva contra o parasita, (ii) identificar regiões dessas proteínas que estão diretamente envolvidas em mecanismos usados pelo parasita para infectar células, bem como em desenvolver novas formas invasivas e (iii) avaliar a sua habilidade de induzir resposta imune efetiva contra o parasita (García *et al.*, 2006).

Sendo assim, diferentes antígenos vem sendo identificados e isolados de diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium* e utilizados como base em vacinas de subunidades

contra a malária. A maioria dessas vacinas experimentais utiliza antígenos expressos na fase pré-eritrocítica, visando impedir a infecção do hospedeiro e o futuro aparecimento dos sintomas clínicos. Antígenos como o antígeno do estágio hepático 3 (LSA3), a proteína da superfície do esporozoíta 2 (SSP2) ou proteína anônima relacionada a trombospondina (TRAP) (Webster & Hill, 2003) e a proteína do circumsporozoíta (CS) já foram descritos como base em vacinas experimentais. Entretanto, elas apresentam sucesso limitado (Moorthy *et al.*, 2004).

Na fase eritrocítica do ciclo, uma vacina experimental efetiva poderia impedir a infecção de hemácias sadias e/ou inibir o sequestro do parasita nos microcapilares, atenuando os sintomas clínicos e reduzindo as chances de complicações e as taxas de mortalidade. A maioria das vacinas estudadas capaz de atuar contra estágios sanguíneos do parasita baseia-se em antígenos de superfície responsáveis pela invasão de hemácias sadias, que servem como ligantes do parasita a essas células. Neste sentido, a proteína de superfície do merozoíta 1 (MSP1) é o antígeno envolvido na invasão de eritrócitos mais bem caracterizado. Estudos clínicos em dois diferentes países africanos revelaram que a presença de anticorpos contra o fragmento de 19kDa na porção carboxi-terminal da molécula de MSP1 de *P. falciparum* (PfMSP1) estava associada a diminuição dos sintomas clínicos da doença (Egan *et al.*, 1996). Além disto, após purificação, estes anticorpos foram capazes de competir com monoclonais inibidores da invasão de merozoítas de *P. falciparum*, e inibir o crescimento do parasita (Weiss *et al.*, 1998; Egan *et al.*, 1999). Estes resultados fazem com que a MSP1 venha sendo utilizada nos últimos anos como base de diferentes vacinas experimentais (Webster & Hill, 2003). A eficácia de uma vacina baseada na PfMSP1 está sendo avaliada em primatas não humanos após desafio com formas sanguíneas de *P. falciparum* (Kumar *et al.*, 2000) e a toxicidade e imunogenicidade estão sendo testadas em humanos (Weiss *et al.*, 1998).

Entretanto, alguns dos pacientes imunizados nestes estudos apresentaram reações de hipersensibilidade após várias doses (revisado por Webster & Hill, 2003), mostrando a necessidade de buscar formulações alternativas. Além disto, a recente descoberta de anticorpos anti-MSP1 capazes de bloquear a atividade de imunoglobulinas protetoras (Holder *et al.*, 1999), e a existência de vias paralelas de invasão, podem limitar a eficácia de uma vacina baseada em MSP1.

Outra molécula, denominada antígeno apical de membrana 1 (AMA1) também tem sido considerada como candidata a vacina contra o estágio eritrocítico, por ser relativamente conservada entre diferentes espécies, e pelo fato de que anticorpos humanos capazes de reconhecer este antígeno inibem a invasão de eritrócitos sadios por merozoítas livres (Holder *et al.*, 2001).

Recentemente, a proteína da membrana de eritrócito de *P. falciparum* 1 (PfEMP1), que é expressa na superfície dos eritrócitos infectados tem sido utilizada como vacina experimental visando evitar o sequestro dessas células e as complicações clínicas da doença, como a malária cerebral e gestacional. Entretanto, este antígeno é codificado a partir de genes variáveis (genes *var*) que são responsáveis pela variação antigênica em *P. falciparum* (Craig & Scherf, 2000). Este mecanismo de variação confere um caráter altamente polimórfico para esta molécula, podendo comprometer a eficácia de uma vacina baseada na PfEMP1.

Apesar de inúmeros esforços, até agora somente a RTS,S/AS02A, uma vacina pré-eritrocítica que tem como alvo a proteína do circunsporozoíta (CS), tem sido testada em humanos e demonstrado uma eficácia protetora significativa em estudos de desafio e ensaios clínicos em países onde a malária é endêmica (revisado por Bojang, 2006). O recente sucesso da fase IIb de ensaios clínicos demonstrou que RTS,S é capaz de reduzir a malária clínica em 35% e a malária severa em 49% (Alonso *et al.*, 2004) e tornou essa vacina a mais promissora

candidata para o uso na imunoprofilaxia da doença. Esses resultados indicam que é possível obter uma vacina efetiva contra a malária baseada em sequências peptídicas derivadas de proteínas com papel relevante na infecção de células hospedeiras pelo *Plasmodium* spp.

1.1.4. O antígeno MAEBL.

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

MAEBL apresenta uma estrutura molecular com domínio homólogo a proteínas *Duffy Binding Like* (DBL) na região carboxi-terminal. Por outro lado, sua porção amino-terminal, rica em cisteínas, apresenta similaridade com o domínio de 44 kDa do antígeno apical de membrana 1 (AMA1). A similaridade de cada região deste antígeno a duas proteínas distintas confere um caráter quimérico a esta molécula. Também foi mostrado que este antígeno é capaz de se ligar a eritrócitos, caracterizando esta família protéica como um novo tronco de uma superfamília de moléculas de adesão de parasitas (Kappe *et al.*, 1997; 1998).

O gene *maebl* de *P. yoelii* e *P. berghei* é composto de uma única cópia e possui uma estrutura de vários exons, cada exon representando um domínio funcional (Figura 2; Kappe *et al.*, 1998). O exon 1 codifica o peptídeo sinal da molécula; o exon 2 os domínios M1 e M2, similares aos domínios ricos em cisteína de AMA1, uma região repetitiva e uma região carboxil também rica em cisteínas com grande homologia a antígenos EBP-DBL; o exon 3

uma região transmembrânica; enquanto que o quarto e quinto exon codificam uma cauda citoplasmática.

Os domínios M1 e M2 do antígeno MAEBL de *P. yoelii* foram identificados como os responsáveis pela ligação desta molécula a eritrócitos. Esta propriedade adesiva é similar àquela observada pelos antígenos DBL de *P. vivax*, *P. knowlesi* e *P. falciparum* (Adamns *et al.*, 2001). Os motivos presentes no antígeno MAEBL de *P. falciparum* que apresentam esta capacidade adesiva foram recentemente descobertos utilizando peptídeos correspondentes a diferentes porções dos domínios M1 e M2. (Ocampo *et al.*, 2004). Neste trabalho, foi demonstrada a capacidade de alguns destes peptídeos em inibir a invasão de merozoítas de *P. falciparum* e a existência de dois motivos de adesão no domínio M1 e cinco no domínio M2. Estes resultados sugerem o domínio M2 como o principal responsável pela capacidade adesiva da molécula.



Figura 2: Estrutura do gene *maeb1* de *P. yoelii* e *P. berghei*. S: peptídeo sinal; M1: domínio rico em cisteínas M1; M2: domínio rico em cisteínas M2; C-Cis: porção carbox-terminal rico em cisteínas; TM: domínio transmembrânico; CC: cauda citoplasmática.

Também foi mostrado que o gene *maeb1* de *P. falciparum* possui maior grau de homologia com seu correspondente em *P. yoelii* e *P. berghei*, do que com os genes *pfama1*

ou *eba175* também de *P. falciparum* (Ghai *et al.*, 2002). Além disto, este estudo revelou que, tal qual no antígeno MAEBL expresso em *P. yoelii* e *P. berghei*, o seu correspondente expresso em *P. falciparum* também apresenta atividade adesiva mediada principalmente pela região M2. Ainda neste trabalho, foi observado que o soro de pacientes provenientes de regiões endêmicas foi capaz de reconhecer uma proteína recombinante (r-PfM2) baseada na porção M2 do MAEBL de *P. falciparum* e inibir a adesão da r-PfM2 a eritrócitos. Estas evidências tornam o modelo murino de grande relevância para a análise de vacinas experimentais baseadas no antígeno MAEBL.

O antígeno MAEBL foi descrito primeiramente em merozoítas sanguíneos, mas a expressão desta molécula também foi observada em esporozoítas de *P. yoelii*, *P. berghei* e *P. falciparum* coletados a partir de glândulas salivares de mosquitos infectados (Kappe *et al.*, 2001; Kariu *et al.*, 2002; Ghai *et al.*, 2002). Em experimentos de depleção gênica foi mostrado que MAEBL é essencial para a infecção dos esporozoítas nas glândulas salivares do mosquito vetor, sugerindo sua implicação na migração do esporozoíta na glândula salivar (Kariu *et al.*, 2002, Saenz *et al.*, 2008). Preiser *et al.* (2004) mostraram que MAEBL é expresso de maneira diferenciada em esporozoítas da glândula salivar e em esporozoítas presentes no intestino do inseto vetor. Além disto, estes autores demonstraram que anticorpos capazes de reconhecer o antígeno MAEBL de *P. yoelii* inibem o desenvolvimento do parasita em culturas primárias de hepatócitos infectados por esporozoítas. Estes dados sugerem fortemente a participação desta proteína também no desenvolvimento do estágio hepático no hospedeiro vertebrado.

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

1.2. *Salmonella*.

1.2.1. Vacinas recombinantes.

A vacinação é a melhor estratégia em saúde pública para a profilaxia de doenças infecciosas (Kaufmann *et al.*, 2001; Marshal *et al.*, 2000). As vacinas induzem o sistema imune de tal forma que ele responda de maneira rápida e efetiva quando em contato com agentes infecciosos, evitando a ocorrência de infecção e/ou o desenvolvimento da doença (Roussilhon, 2007).

Diversas estratégias são empregadas no desenvolvimento de vacinas. As vacinas vivas atenuadas contêm microrganismos vivos que infectam o hospedeiro de uma forma similar a que ocorre na infecção natural sem, no entanto, causar doença, estimulando assim uma resposta imune protetora, como no caso da vacina BCG. As vacinas mortas ou inativadas se baseiam na inativação de microrganismos inteiros, como algumas vacinas para influenza e outras doenças virais. Já as vacinas de subunidades são constituídas de antígenos purificados naturais, sintéticos ou recombinantes, como, por exemplo, a vacina contra a hepatite B (revisto por Criado *et al.*, 2008). A mais recente tecnologia utilizada no desenvolvimento de vacinas é o uso de preparações de DNA que codificam um imunógeno protetor inserido em vetores plasmidiais (vacinas gênicas ou de DNA). A imunização com vacinas de DNA tem se mostrado uma ferramenta promissora em conferir imunidade protetora em diferentes modelos animais experimentais de doenças infecciosas e tumores (Schoen *et al.*, 2004).

Entretanto, a vacinação genética pode apresentar ineficiência inerente à maneira com que os plasmídios são processados pelo sistema imune, gerando a necessidade de utilizar sistemas que melhoram a eficácia dessas vacinas e direcionam a sua apresentação aos sítios

indutivos da resposta imune (Darji *et al.*, 1999). Sendo assim, bactérias que tem como alvo células do sistema imune, são veículos atrativos para a apresentação de antígenos e tem sido desenvolvidas como carreadores vivos para induzir respostas protetoras contra uma grande variedade de antígenos heterólogos expressos. O emprego de diversas linhagens bacterianas atenuadas quanto à virulência como carreadoras de vacinas de DNA, compondo as chamadas vacinas vetorizadas, tem sido bastante estudado nos últimos anos.

Trabalhos recentes são focados no uso de bactérias, particularmente as espécies enteroenvasivas como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* (Shata *et al.*, 2000, Schoen *et al.*, 2004) como carreadoras de moléculas terapêuticas e profiláticas no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra inúmeras doenças em humanos e animais (Seavey *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2008; Heinzmann *et al.*, 2008; Branger *et al.*, 2007; Fraillery *et al.*, 2007). A vantagem para o uso dessas linhagens bacterianas atenuadas é o fato de que elas possuem a via oral como rota natural de infecção e são capazes de induzir contra o antígeno carregado não somente a imunidade a nível sistêmico, mas também a imunidade de mucosas (Husseiny & Hensel, 2005), o que muitas vezes não ocorre quando proteínas são administradas por via oral na forma solúvel. Além disso, protegem a integridade do antígeno durante a passagem pelo trato gastrointestinal, permitindo a apresentação de uma dose adequada ao sistema imune (Spreng e Viret, 2005).

1.2.2. *Salmonella* e vacinas recombinantes.

Dentre os microrganismos utilizados como carreadores de antígenos heterólogos, linhagens atenuadas de *Salmonella enterica* estão entre as mais utilizadas e bem caracterizadas (Atkins *et al.*, 2006). O uso de *Salmonella enterica* em imunizações baseia-se

na descoberta de que esta bactéria se liga, invade e persiste no GALT (tecido linfóide associado ao intestino), que antígenos entregues ao GALT desencadeiam uma resposta imune secretória generalizada, além de resposta imune humoral e celular e que atenuações em *S. enterica* não tem efeito no tropismo da bactéria por esse tecido (Curtiss *et al.*, 1990).

Salmonella spp é um gênero pertencente à família *Enterobacteriaceae* formado por bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos e geralmente flagelados (Mastroeni e Maskell, 2006). É um gênero altamente heterogêneo e, atualmente, são conhecidas mais de 2.500 sorovariedades de *S. enterica* (Poppof *et al.*, 2004), classificadas de acordo com a identificação da variabilidade dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi), este último quando presente (Kaufman, 1978). Apesar da diversidade antigênica conhecida, estudos baseados em hibridação DNA-DNA (DDH) classificam essa bactéria em apenas duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* subdivide-se em 7 subespécies, e a grande maioria das sorovariedades patogênicas para o homem é incluída na subespécie *enterica* (Boyd *et al.*, 1996). Uma terceira espécie, *S. subterrânea*, foi descrita recentemente por Shelobolina *et al.* (2004). Entretanto, novos estudos de DDH são requeridos para melhor definir a unidade taxonômica desta possível nova espécie.

A infecção por *S. enterica* inicia-se com a ingestão de água ou alimentos contaminados, particularmente alimentos derivados de aves e suínos. As sorovariedades patogênicas de *S. enterica* podem causar, em mamíferos, infecções com diferentes graus de gravidade (Salyers e Whitt, 1994), que vão desde gastroenterites localizadas até infecções sistêmicas graves, dependendo da sorovariedade bacteriana e do hospedeiro envolvido (Fierer e Guiney, 2001). *S. enterica* Typhimurium e Enteritidis são sorovariedades causadoras de gastroenterites em humanos, mas podem também estar associadas a infecções extra-intestinais (Salyers *et al.*, 2002). Em camundongos, podem causar um tipo de infecção

muito semelhante à febre tifóide humana. *S. enterica* Typhi causa a febre tifóide, uma infecção sistêmica grave no homem (Salyers *et al.*, 2002). *S. enterica* Choleraesuis causa infecções sistêmicas graves, principalmente em suínos, embora também possa causar infecções em humanos (Salyers *et al.*, 2002). *Salmonella enterica* Dublin é uma sorovariedade associada principalmente a bovinos. Como *S. enterica* Typhi em humanos, a sorovariedade Dublin é sempre invasiva e pode causar gastroenterites e septicemia nesses animais (Mizuno *et al.* 2007).

As sorovariedades de *S. enterica* são patógenos intracelulares facultativos e, após administração oral, iniciam a infecção através da invasão de células M na mucosa intestinal, atingindo os sítios linfóides das placas de Peyer (Huang *et al.*, 2000). Neste local, replica-se e persiste, servindo como fonte de antígenos e induzindo resposta imune. A bactéria sobrevive e prolifera no interior de células do sistema imune, como os macrófagos, não apenas nas placas de Peyer, mas também em outros órgãos, como baço, fígado e linfonodos regionais, induzindo assim, resposta imune sistêmica (Huang *et al.*, 2000). Uma vez dentro de macrófagos, *S. enterica* pode induzir morte celular ou estabelecer um nicho intracelular dentro do vacúolo fagocítico (Monack *et al.*, 2001). Mais recentemente, foi observada a capacidade de *S. enterica* de invadir e sobreviver também em células dendríticas (Biedzka-Sarek e Skurnik, 2006).

Essa capacidade de alcançar células do sistema imune faz com que *S. enterica* tenha um potencial altamente imunogênico (Hindle *et al.*, 2002). A resposta imune humoral é desencadeada principalmente em resposta ao LPS, enquanto a resposta imune celular, principalmente de linfócitos T CD4⁺, é desencadeada em resposta a antígenos flagelares (Fierer & Guiney, 2001). A observação de resposta imune frente a infecções por *S. enterica* induziu pesquisadores a proporem o desenvolvimento de vacinas para o controle dessas

infecções (revisado por Cárdenas & Clements, 1992). A baixa imunogenicidade de vacinas baseadas em células mortas de *S. enterica* levou ao desenvolvimento de linhagens vivas atenuadas. Vacinas vivas induzem imunidade pela simulação de infecções naturais utilizando formas atenuadas do patógeno (Rappuoli *et al.*, 2001).

1.2.3. Mutações que atenuam a virulência.

Levando em consideração o fato de que uma vacina ideal deve ser avirulenta e altamente imunogênica, linhagens atenuadas de *S. enterica* são boas candidatas a vacinas vivas orais, incluindo o potencial de atuar como carreadoras de antígenos heterólogos (Medina & Guzman, 2001). Essas linhagens persistem e multiplicam-se por um breve período de tempo nos tecidos hospedeiros, mantendo a capacidade de colonizar o GALT e invadir órgãos e tecidos mais profundos, induzindo a imunidade celular e humoral, sistêmica e de mucosas, sem levar o hospedeiro a sofrer danos significativos (Cárdenas *et al.*, 1994).

Um grande número de mutações atenuadoras, que rendem vetores bacterianos seguros e imunogênicos para uso em humanos, vem sendo identificado. Essas mutações podem conferir auxotrofia, interferir com o metabolismo de açúcares e a biossíntese de LPS ou afetar a regulação global de genes necessários à virulência (Curtiss *et al.*, 1993), sem interferir na imunogenicidade. Muitas linhagens virulentas de *S. enterica* foram atenuadas e geneticamente modificadas através da introdução de mutações definidas em um ou mais genes e se tornaram disponíveis comercialmente para serem usadas como carreadores de antígenos de outros patógenos bacterianos, virais ou protozoários.

Mutantes na via biossintética de aminoácido aromáticos $\Delta aroA$, $\Delta aroC$, $\Delta aroD$, deficientes em transportar íons Fe (revisado por Tacket *et al.*, 1997), mutantes Δcya Δcrp ,

incapazes de expressar adenilato ciclase e o receptor para cAMP (Tacket *et al.*, 1997), mutantes para o sistema regulatório de dois componentes *phoP-phpQ* (Hohmann *et al.*, 1996), mutantes $\Delta galE$, deficiente em UDP-galactose, *ompR* e *htrA* (Chatfield *et al.*, 1994), mutantes $\Delta himA$ e $\Delta himD$ (Mendes *et al.*, em preparo) entre outros, foram construídos e demonstraram-se imunogênicos, apesar da atenuação.

A atenuação de *Salmonella enterica* pela deleção de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos aromáticos foi descoberta e desenvolvida por Stocker (Hoiseith & Stocker, 1981). O bloqueio na via biossintética de aminoácidos aromáticos (genes *aro*) causa um requerimento para metabólitos aromáticos indisponíveis nos tecidos de mamíferos em concentrações suficientes, como o ácido p-aminobenzóico, precursor do ácido fólico e o ácido 2,3-diidrobenzóico, precursor da enterochelina, responsável pela captura de íons Fe (Edward & Stockers, 1988). Essas deleções atenuam a virulência de forma segura e efetiva, resultando em linhagens potenciais para serem usadas como vacinas vivas. Essas linhagens se mostram excelentes vacinas orais, induzindo uma forte imunidade humoral, local e celular no hospedeiro, demonstrando um grande potencial para ser usada como carreadora de antígenos heterólogos para o sistema imune de mamíferos (Chatfield, 1989), conforme demonstrado em muitos trabalhos (Covone *et al.*, 1998; Ascón *et al.*, 1998; Brocchi *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1995; Fagan *et al.*, 2001; Pacheco *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007).

1.2.4. Expressão de antígenos em linhagens vacinais de *S. enterica*.

O sucesso da imunização utilizando linhagens atenuadas de *S. enterica* é dependente da estabilidade e da manutenção do plasmídeo recombinante (Curtiss *et al.*, 1990). É fundamental que as linhagens utilizadas como vetores vacinais sejam capazes de expressar o

antígeno heterólogo de forma estável e em quantidades suficientes para induzir o sistema imune na ausência de pressão seletiva por antibiótico (Wu *et al.*, 1995).

No início, a clonagem e expressão de antígenos em *S. enterica* eram alcançadas através da utilização de plasmídios carregando genes de resistência a antibióticos como determinante de seleção para a manutenção do plasmídio (Cárdenas e Clements, 1992). Alguns estudos demonstraram, no entanto, que na ausência de pressões seletivas, tais plasmídios eram instáveis e, portanto, perdidos após poucos ciclos de replicação *in vivo* (Cárdenas e Clements, 1992; Dunstan *et al.*, 2003) ou até mesmo durante o cultivo *in vitro* (Everest *et al.*, 1995), perdendo assim a capacidade de sintetizar o antígeno heterólogo. Para resolver tais problemas, diversas estratégias foram adotadas para permitir a estável e eficiente expressão de antígenos heterólogos *in vivo*, como a utilização de promotores induzidos *in vivo* no controle de expressão do antígeno (Cheminay e Hensel, 2007; Marshall *et al.*, 2000), a integração do gene heterólogo no cromossomo de *S. enterica* (Hone *et al.*, 1988; Strugnell *et al.*, 1990; Everest *et al.*, 1995) e a construção de sistemas letais balanceados (Curtiss *et al.*, 1990; Everest *et al.*, 1995).

Num sistema letal balanceado, um gene essencial à sobrevivência bacteriana é deletado, sendo essa deficiência complementada pela introdução de um plasmídio contendo o gene selvagem e o gene da proteína heteróloga. O exemplo mais conhecido é o sistema letal balanceado *asd* (Galán *et al.*, 1990). A deleção do gene *asd*, no cromossomo bacteriano, acarreta auxotrofia para o ácido diaminopimélico (DAP), um importante aminoácido constituinte da parede celular de bactérias gram-negativas. Na ausência de DAP, mutantes de *S. enterica* auxotróficos para esse D-aminoácido rompem-se após poucos ciclos de replicação. Sendo assim, genes heterólogos são clonados em plasmídios *asd* positivos e estes utilizados para transformar células de *S. enterica* Δasd . Animais imunizados com tais

linhagens recombinantes são colonizados somente por bactérias contendo o plasmídio e, portanto, o gene heterólogo. A efetividade desse sistema foi demonstrada em inúmeros trabalhos de expressão heteróloga de uma grande variedade de antígenos (Tacket *et al.*, 1997, Covone *et al.*, 1998, Kotton *et al.*, 2006).

1.2.5. *Salmonella* em vacinas recombinantes contra *Plasmodium*.

As características de uma vacina para malária devem levar em consideração que 90% das mortes e doenças severas causadas por *Plasmodium* spp ocorrem entre populações habitando alguns dos países mais pobres do mundo (Gómez-Duarte *et al.*, 2001). Neste contexto, a busca de alternativas convenientes para a produção de uma vacina com baixos custos se torna muito importante.

O uso de linhagens atenuadas de *S. enterica* em vacinas recombinantes oferece inúmeras vantagens: (i) são manipuláveis geneticamente; (ii) invadem as placas de Peyer e são capazes de estimular uma boa resposta imune celular e humoral nas mucosas, já que infectam por via oral; (iii) oferecem o potencial para rápida indução de imunidade protetora após uma única dose; (iv) podem ser produzidas em grandes quantidades de uma forma relativamente fácil e com baixos custos; (v) são estáveis e podem ser liofilizadas, permitindo a estocagem sem refrigeração (Atkins *et al.*, 2006). Estes fatores somados fazem de *S. enterica* um organismo particularmente interessante para a produção de vacinas recombinantes orais e esta estratégia de vacinação uma forte candidata para programas de imunização em massa.

Na busca de uma vacina para a malária, um sistema bacteriano recombinante usando *S. enterica* atenuada como carreador de antígenos de *Plasmodium* spp pode ser particularmente valioso. De fato, alguns estudos já foram realizados neste sentido, a maioria

utilizando antígenos expressos na fase pré-eritrocítica, como a proteína do circumsporozoíta (CS), o antígeno do estágio hepático 3 (LSA3) e a proteína da superfície do esporozoíta 2 (SSP2) (Somner *et al.*, 1999). Experimentos mostraram que vacina oral de *S. enterica* expressando CSP é capaz de proteger contra a malária murina na ausência de anticorpos (Sadoff *et al.*, 1988). Estudos subsequentes mostraram que linfócitos T citotóxicos antígeno-específicos eram responsáveis por essa proteção (Aggarwal, 1990). Gómez-Duarte *et al.* (2001) demonstraram a indução de relevante resposta imune mediada por células (células secretoras de IFN- γ) quando a proteína SSP2 de *P. falciparum* foi expressa por uma linhagem atenuada de *S. enterica* Typhi.

Na fase eritrocítica, o antígeno mais usado em vacinas baseadas em linhagens atenuadas de *S. enterica* é o MSP1. Camundongos imunizados com *S. enterica* recombinante expressando MSP1 de *P. berghei* mostraram baixa ou nenhuma resposta de anticorpos, sugerindo que a imunidade mediada por células é importante para a proteção e mostrando que é possível construir uma vacina oral efetiva contra o estágio eritrocítico do parasita da malária (Somner *et al.*, 1999; Toebe *et al.*, 1997, Qian & Pan, 2002).

Todos estes estudos demonstraram uma baixa resposta imune humoral que pode ser requerida na proteção contra algumas fases de infecção por *Plasmodium* spp. Contudo, estes resultados muito provavelmente são dependentes do tipo de antígeno expresso, uma vez que *S. enterica* é capaz de induzir, contra o antígeno carregado, tanto a resposta humoral como a celular. Em estudo com outro parasita, Lee *et al.* (2000) demonstraram a indução em camundongos de resposta humoral e proliferação celular frente a glutathione S-transferase (GST) de *Schistosoma haematobium*, quando este antígeno foi expresso por uma linhagem atenuada de *S. enterica*.

Até o momento, nenhum estudo havia sido feito na tentativa de construir uma linhagem atenuada de *S. enterica* carreadora do antígeno MAEBL.

2. OBJETIVOS.

Este trabalho teve por objetivo central a obtenção de uma linhagem atenuada de *Salmonella enterica* Typhimurium expressando o domínio M2 do antígeno MAEBL de *Plasmodium yoelli*, com a finalidade de desenvolver um protótipo de uma vacina efetiva contra a malária no modelo murino.

Os objetivos específicos foram:

1. Construção de linhagens recombinantes de *S. enterica* produtoras da proteína M2 através da clonagem da região do gene *maebl* codificadora para o domínio M2 da proteína MAEBL.
2. Avaliação da capacidade de expressão *in vitro* da proteína heteróloga.
3. Avaliação da capacidade de invasão e persistência das linhagens recombinantes em órgãos linfóides de camundongo BALB/c/AnUnib.
4. Avaliação da imunogenicidade da formulação vacinal obtida.
5. Avaliação da capacidade protetora dessa vacina recombinante no modelo murino da malária.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Linhagens Bacterianas.

As linhagens bacterianas utilizadas estão descritas na Tabela I.

TABELA I: Linhagens Bacterianas Utilizadas

| Bactéria | Genótipo | Referência |
|--------------------------------------|--|-----------------------------------|
| <i>E. coli</i> χ 6212 | F'endA1 <i>hsdR</i> 17(r_k^- m_k^+) <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>recA</i> 1 <i>gyrA</i> (Nalr) <i>relA</i> 1 Δ (<i>lacIZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (ϕ 80 <i>diac</i> Δ (<i>lacZ</i>) M15) Δ <i>asd</i> | Nakayama <i>et al.</i> , 1988 |
| <i>E. coli</i> DH5 α | F'endA1 <i>hsdR</i> 17(r_k^- m_k^+) <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>recA</i> 1 <i>gyrA</i> (Nalr) <i>relA</i> 1 Δ (<i>lacIZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (ϕ 80 <i>diac</i> Δ (<i>lacZ</i>) M15) | Hanahan, 1983 |
| <i>S. enterica</i> χ 3987 UK-1 | pStV1 ⁺ Δ <i>cya</i> -12 Δ <i>crp</i> -11 Δ <i>asdA</i> 1 Δ [<i>zhf</i> -4:: <i>Tn</i> 10] | Gentry-Weeks <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>S. enterica</i> χ 4550 SR-11 | pStSR101 ⁺ <i>gyrA</i> J816 Δ <i>crp</i> -1 Δ <i>asdA</i> 1 Δ (<i>zhf</i> -4:: <i>Tn</i> 10) Δ <i>cya</i> -1 | Schödel <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>S. enterica</i> H683 | Δ <i>aroA</i> Δ <i>aroD</i> Δ <i>asdA</i> 1 | Galán <i>et al.</i> , 1990 |
| <i>S. enterica</i> MST1761 | <i>leuA</i> 414(<i>Am</i>) <i>hsl</i> (<i>r-m</i> ⁺) <i>Fel</i> 2 ⁻ <i>supE</i> 40 | Maloy, 1996 |

E. coli DH5 α foi utilizada para a amplificação do plasmídio pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin USA) e de clones recombinantes derivados deste. A linhagem de *E. coli* χ 6212 é um mutante Δ *asd* que exibe alta frequência de transformação e foi utilizada para a amplificação dos plasmídios pYA3137 e derivados.

A linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium χ 3987, cortesia do Prof. Dr. Roy Curtiss III (Washington University, Washington – D.C.) foi utilizada para expressar a região *m2* do antígeno MAEBL e como doadora de plasmídios às linhagens χ 4550 e H683, por

transdução generalizada com bacteriófago P22HT. A linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium H683 foi utilizada nos experimentos de imunização. A linhagem MST1761 foi utilizada para a produção de altos títulos de fago P22HT.

As linhagens bacterianas foram estocadas a -80°C em meio LB com glicerol 2,5M.

3.2. Plasmídios.

Os plasmídios utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela II.

TABELA II: Plasmídios Utilizados

| Plasmídios | Características | Referência |
|---------------------------|---|---------------------------------------|
| pYA3137 | Asd ⁺ , plasmídio de alto número de cópias (<i>oriR</i> de pUC18) | Covone <i>et al.</i> , 1998 |
| pYA3137trc | Asd ⁺ , plasmídio de alto número de cópias (<i>oriR</i> de pUC18) contendo o promotor constitutivo <i>trc</i> | Brandão <i>et al.</i> , não publicado |
| pYA3137trcm2 | Asd ⁺ , plasmídio pYA3137 contendo o gene <i>m2</i> de <i>P.yoelii</i> clonado | Este estudo, não publicado |
| pYA3137trcnapA | Asd ⁺ , plasmídio pYA3137 contendo o gene <i>napA</i> de <i>H. pylori</i> clonado | Sanches, 2002, não publicado |
| pGEM-T[®] | Ap ^r , plasmídio de clonagem de produtos de PCR | Promega Corporation |
| pIgSPm2 | Plasmídio de expressão. Modificado de pCDNA3 contendo o gene <i>m2</i> de <i>P.yoelii</i> clonado | Costa <i>et al.</i> , não publicado |

Ap^r: Resistente a ampicilina, Asd⁺: Contém o gene *asd*, *oriR*: Origem de Replicação

O plasmídio pYA3137 pertence ao sistema letal balanceado *asd*, um sistema estável de expressão de antígenos heterólogos em linhagens vacinais de *S. enterica* e foi utilizado para expressar a proteína M2 de *P. yoelii*. O plasmídio pYA3137trcnapA, construído

previamente em nosso laboratório e que contém o gene *napA* de *H. pylori* sob controle do promotor *trc* foi digerido com enzimas de restrição para liberação do gene *napA* que foi substituído pelo fragmento de DNA correspondente ao domínio *m2* de *maebl*. Esta sequência foi obtida por PCR, gerando assim o vetor pYA3137*trcm2*.

pGEM-T[®] foi utilizado para clonar a sequência *m2* obtida por PCR, reação que teve como molde para as ampliações o plasmídeo pIgSP*m2*.

3.3. Meios de cultura e condições de cultivo bacteriano.

O meio de cultura rotineiramente utilizado foi LB ou LB-Ágar (Sambrook e Russel, 2001) e, por algumas vezes, o ágar MacConKey (Bio Life Technologies). Os antibióticos ácido nalidíxico e ampicilina, quando requeridos, foram utilizados nas concentrações de 15µg/mL e 100µg/mL respectivamente, conforme Sambrook e Russell (2001). O ácido diaminopimélico (DAP) (Sigma-Aldrich, St.Louis- MO, USA) foi utilizado na concentração final de 50µg/mL para o crescimento das linhagens Δ *asd* de *E. coli* χ 6212 e *S. enterica* Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683, todas auxotróficas para este composto. As culturas foram incubadas a 37°C por, aproximadamente, 16 horas em estufa. Culturas líquidas foram crescidas sob agitação (200rpm) para a aeração.

3.4. Animais.

Foram utilizados camundongos fêmeas isogênicos BALB/c/AnUnib (Zentralinstitut fur Versuchstierzucht (ZFV), Hannover, Germany, 1987) de 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP.

3.5. Construção dos vetores e linhagens.

3.5.1. Seleção dos iniciadores para a amplificação do domínio M2 do gene *maebl* de *Plasmodium yoelii*.

Para amplificar a sequência de cerca 1,2 kb referente ao domínio M2 da proteína codificada pelo gene *maebl*, foram desenhados dois iniciadores, baseados no genoma de *P. yoelii*, utilizando-se o software *Primer3* (Steve *et al.*, 2000) versão on-line. Aos iniciadores foram adicionadas sequências que permitiram a criação de sítios de restrição nas regiões amplificadas. Ao iniciador M2Ftrc foi adicionada uma sequência a 5' criando um sítio *BamHI* e a M2R adicionado o sítio *SalI* a 3' do mesmo. Os iniciadores, descritos na Tabela III, foram sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc.(IDT, Coralville - IA, USA) na escala de 100 nmoles.

3.5.2. Amplificação do gene *maebl* por PCR.

As reações de amplificação de DNA seguiram protocolos padrões (Sambrook e Russell, 2001; Ausubel *et al.*, 2003). Nas reações envolvendo clonagem foi utilizada a enzima Platinum® Taq DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad – CA, USA), para minimizar a ocorrência de erros. Para a amplificação de *m2*, as reações foram realizadas em volume final de 50 µL contendo 10 pmol/µL de cada iniciador, 20 a 30ng de DNA ,1mM de cada dNTP, 2U de Taq DNA polimerase e 2mM de MgCl₂, em tampão apropriado provido com a enzima. Como molde para as amplificações foi utilizado o plasmídeo pIgSP*m2*. O DNA foi desnaturado a 92°C por 2 minutos e a amplificação feita por

35 ciclos de: 92°C por 30 segundos, 51°C por 30 segundos, 72°C por 1,5 minuto. A extensão final foi feita a 72°C por 10 minutos. Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador MJ Research PTC-200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Waltham, MA).

TABELA III: Iniciadores Utilizados

| Iniciadores | Sequência 5' – 3' |
|--------------------|--|
| M2Ftrc | GCGGCGGATCCATGCTTAACAAATATATGAAATCTAAT |
| M2R | GCGGCGTCGACTTACCATTTTCGATTCATCGGTAT |

Os sítios de restrição *Bam*HI e *Sal*I estão sublinhados.

3.5.3. Eletroforese em gel de agarose.

Os produtos gerados na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen UltraPure™) a 1%, preparado com tampão 1X TBE (45 mM Tris-borato e 1mM EDTA), em sistema horizontal (Horizon® 58 Gel Electrophoresis Apparatus, Life Technologies). As amostras foram ressuspensas em tampão de ressuspensão (sacarose 40%, bromofenol 0,25% e água destilada). A corrida foi conduzida a uma tensão de 74V. O tampão utilizado para a corrida foi o mesmo utilizado no preparo do gel.

Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) e o DNA visualizado em transiluminador de U.V., sendo os resultados registrados com a câmera Kodak DC120 e analisados no software fotográfico Kodak 1D Science (Kodak, USA).

3.5.4. Purificação do fragmento *m2* do gene *maebl* em gel de agarose.

Os fragmentos de DNA correspondentes a sequência *m2* gerados por PCR e analisados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen UltraPure™) foram posteriormente purificados, seguido de extração com o kit Perfectprep® Gel Cleanup (Eppendorf, Hamburg - Germany), de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante.

3.5.5. Clonagem de *m2* no plasmídio pGEM-T®.

Os fragmentos de DNA purificados em gel foram ligados a plasmídios pGEM-T® (Promega Corporation, WI – USA) de acordo com Sambrook e Russell (2001). Plasmídio e fragmento de DNA foram misturados na proporção de 1:3, respectivamente, na presença de tampão de ligação e enzima T4 DNA ligase (Promega Corporation, WI – USA) e incubados a 4°C por 16 horas, seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. A ligação foi utilizada para transformar células competentes de *E.coli* DH5α por choque térmico.

3.5.6. Preparação de células bacterianas competentes para transformação por choque térmico.

O preparo de células competentes para transformação por choque térmico foi realizado conforme descrito em Ausubel *et al.* (2003). As linhagens foram cultivadas em 3mL de meio SOC a 37°C sob agitação por 16 horas. No dia seguinte, uma proporção de 1:100 foi inoculada em meio SOC e re-incubadas a 37°C sob agitação até atingir a DO de 0,5 ($\lambda = 600\text{nm}$). As culturas foram então esfriadas em banho de gelo e centrifugadas a 4.000rpm (microcentrífuga 5415R/ rotor F45-24-11, Eppendorf) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em solução de CaCl₂ (50mM) esterilizada e previamente resfriada a 4°C. A suspensão foi então incubada em banho de gelo por 3 horas e,

em seguida, centrifugada a 4.000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em solução de CaCl₂ (50mM) e 15% de glicerol na proporção de 1:100 do volume inicial. O volume obtido foi distribuído em alíquotas de 100µl em tubos de microcentrífuga esterilizados e previamente resfriados em gelo, sendo em seguida congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Por esse método, foram preparadas células de *E.coli* DH5α e *E. coli*χ6212.

3.5.7. Transformação bacteriana por choque térmico.

A transformação pelo método de choque térmico foi realizada conforme descrito em Ausubel *et al.* (2003). As células bacterianas de *E.coli* DH5α e *E.coli* χ6212, previamente preparadas, foram descongeladas vagarosamente em gelo e transformadas com os plasmídios pGEM-Tm2, pYA3137 e pYA3137trcm2, respectivamente. Os plasmídios foram adicionados às células de tal forma que a proporção entre solução de DNA e suspensão bacteriana não ultrapassasse 1:10, em tubos de microcentrífuga. A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, seguida de choque térmico a 42°C por 90 segundos e novamente incubada em gelo por 2 minutos. O volume de 1mL de meio SOC foi então adicionado às células e a cultura incubada por 1 hora a 37°C sob agitação. Após esse período, as células foram centrifugadas a 12.000rpm (microcentrífuga 5415R/ rotor F45-24-11, Eppendorf) por 1 minuto para sedimentação. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 200µL de meio LB. A suspensão foi plaqueada em meio LA suplementado com ampicilina ou ácido nalidíxico, na concentração requerida. As placas foram incubadas por 16 horas e os clones resultantes foram submetidos à extração plasmidial.

3.5.8. Extração dos plasmídios pGEM-Tm2, pYA3137 e pYA3137trcm2 por lise alcalina em pequena escala (mini-prep).

As preparações de DNA plasmidial foram realizadas conforme descrito em Sambrook e Russel (2001). Os clones de *E.coli* DH5apGEM-Tm2, χ 6212pYA3137 e χ 6212 pYA3137trcm2 foram inoculados em 3mL de LB e incubados a 37°C sob agitação a 200rpm. Após 16 horas, foram sedimentados por centrifugação a 12.000rpm (microcentrífuga 5415R/rotor F45-24-11, Eppendorf) a 4°C, por 1 minuto. O sobrenadante de cada cultura foi desprezado, o sedimento ressuscitado em 100 μ L de solução I (Tris-HCl 0,025M, EDTA 0,01M, glicose 0,9%) e incubado em gelo por 5 minutos. Adicionou-se 200 μ L de solução II para a lise celular (NaOH 0,2N e SDS 1%) e as preparações foram mantidas em gelo por mais 5 minutos. Em seguida, 150 μ L de solução III (acetato 5M, potássio 3M), foram acrescentados para neutralizar o pH da reação. Após 15 minutos em gelo, as preparações foram centrifugadas a 4°C e 12.000rpm, por 15 minutos (microcentrífuga 5415R/rotor F45-24-11, Eppendorf). Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos aos quais foram adicionados volumes iguais de fenol/clorofórmio (1:1 v/v). As misturas foram centrifugadas a 4°C, 12.000rpm por 2 minutos e as fases superiores recolhidas em tubos novos. O mesmo volume de clorofórmio foi adicionado e, novamente, as misturas foram centrifugadas e as fases superiores recolhidas em tubo novo. Foi adicionado às suspensões 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e deixadas em gelo por 30 minutos. O DNA foi precipitado por centrifugação (4°C, 12.000rpm, 10 minutos). Os sobrenadantes foram descartados e aos sedimentos foi adicionado 1ml de etanol 70% gelado. Após nova centrifugação, os sobrenadantes foram descartados, os sedimentos secos sob vácuo e ressuscitados em 50 μ L de água Milli-Q esterilizada, sendo as preparações utilizadas imediatamente ou armazenadas a -20°C. Os produtos da mini-prep foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e

os clones com os perfis plasmidiais esperados foram então estocados a -80°C para a continuidade do trabalho.

3.5.9. Purificação de plasmídios.

A purificação dos plasmídios pGEM-*Tm2*, pYA3137 e pYA3137*trcm2* foi realizada utilizando-se o kit Perfectprep® Plasmid Midi (Eppendorf – Hamburg, Germany), seguindo-se a metodologia descrita pelo fabricante. Esses plasmídios foram posteriormente utilizados nos experimentos de clonagem e sequenciamento.

3.5.10. Sequenciamento de DNA.

A sequência *m2* clonada no plasmídio pGEM-*Tm2* foi sequenciada para confirmação da correta amplificação do fragmento que codifica o domínio M2 de MAEBL. Nas reações de sequenciamento foi utilizado o kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (GE Healthcare Life Science), os primers universais T7 e M13/pUC reverse e o sequenciador automático MegaBACE™ (GE Healthcare Life Science), seguindo as condições utilizadas pela Rede Nacional de Sequenciamento (BRGENE), da qual nosso Laboratório faz parte (<http://www.brgene.lncc.br/>). Para montagem dos *contigs* foi utilizado o programa ChromasPro™ versão 1.34 (Technelysium Pty Ltd).

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

3.5.11. Clonagem de *m2* em pYA3137*trc* e transformação em *E.coli* χ 6212.

O plasmídio pGEM-T*m2* obtido por purificação, foi submetido à restrição enzimática com as enzimas *SalI* e *BamHI* (Invitrogen, Carlsbad – CA, USA), simultaneamente, na presença de tampão apropriado. O fragmento de DNA liberado, referente a *m2* foi purificado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, seguido de extração com kit Perfectprep® Gel Cleanup (Eppendorf).

O mesmo procedimento de restrição enzimática foi realizado no vetor pYA3137*trcnapA* contendo o promotor constitutivo *trc* (Sanches, 2002). O fragmento referente a *napA* foi liberado e o plasmídio pYA3137*trc* foi também purificado em gel de agarose 0,8%, e extraído com kit Perfectprep® Gel Cleanup (Eppendorf).

Após otimização da reação, uma relação de 10:1 de fragmento e vetor foi utilizada nas reações de ligação, que foram feitas conforme descrito em Sambrook e Russell (2001), na presença de tampão de ligação e enzima T4 DNA ligase (Promega, Madison, USA). A reação foi incubada a temperatura ambiente por 16 horas e, posteriormente, utilizada para transformar células competentes de *E.coli* χ 6212 por choque térmico, conforme descrito anteriormente.

Os clones resultantes da transformação foram selecionados através de extração plasmidial por mini-prep e os produtos avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, sendo posteriormente submetidos à restrição enzimática com as enzimas *SalI* e *BamHI* simultaneamente, nas condições descritas anteriormente. Os transformantes com os perfis plasmidiais esperados foram estocados a -80°C e, posteriormente, utilizados para a purificação do plasmídio com o kit Perfectprep® Plasmid Midi (Eppendorf – Hamburg, Germany). Esses plasmídios foram utilizados para a transformação das linhagens vacinais de *S. enterica* Typhimurium.

3.5.12. Preparação de células competentes para eletroporação.

A preparação de células competentes de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 foi procedida conforme descrito em Ausubel *et al.* (2003). Esta linhagem foi inoculada em 3mL de meio LB enriquecido com DAP e incubada a 37°C por 16 horas. O volume de 0,5mL dessa cultura foi então inoculado em 50mL de meio LB enriquecido com DAP. A cultura foi novamente incubada a 37°C, sob agitação (250rpm), até atingir a DO₆₀₀ 0,5, quando foi então incubada em banho de gelo por 10 minutos. O volume total da cultura foi centrifugado a 6.000rpm (centrífuga 5804R/ rotor F 34-6-38, Eppendorf) por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi lavado com 20mL de água ultrapura esterilizada e gelada e centrifugado a 6.000rpm (4°C). O mesmo procedimento foi repetido por mais uma vez e em seguida o sedimento foi ressuscitado em 2mL de glicerol (10%) gelado e novamente centrifugado, nas mesmas condições anteriores. O sedimento foi ressuscitado em 200 μ L de glicerol (10%) gelado. As células foram distribuídas em alíquotas de 40 μ L e imediatamente congeladas e armazenadas a -80°C, para serem usadas posteriormente.

3.5.13. Transformação por eletroporação de células de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 com os vetores pYA3137 e pYA3137trcm2.

A transformação da linhagem bacteriana *S. enterica* Typhimurium χ 3987 com o plasmídio pYA3137trcm2 extraído de *E. coli* χ 6212 foi realizada por eletroporação, seguindo protocolo descrito em Ausubel *et al.* (2003). O eletroporador (Eletroporador Bio Rad. Gene Pulser II, Hercules - CA, USA) foi ajustado para 1,5KV, 25 μ F e 200ohms. Para tal finalidade, foram utilizadas cubetas de 0,1cm. Uma proporção de 10:1 de células e plasmídio (cerca de 30ng/ μ L) foi transferida para as cubetas e o pulso foi aplicado. Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1mL de meio SOC e a cultura foi incubada a 37°C por 1 hora. As

amostras submetidas a eletroporação foram plaqueadas em meio LA e incubadas a 37°C durante a noite. Das colônias crescidas, algumas foram recolhidas para extração plasmidial e análise por eletroforese em gel de agarose. As linhagens selecionadas foram estocadas conforme descrito anteriormente.

3.5.14. Preparação do bacteriófago P22HT para transdução.

A linhagem *S. enterica* Typhimurium MST1761 (Maloy, 1996) foi inoculada em 5mL de meio LBEDO [meio LB, 1M D-glicose e E-sal 50x ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ácido cítrico. H_2O , K_2HPO_4 , $\text{NaH}_2\text{NH}_4\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)] e incubada por 16 horas a 37°C. Após o crescimento, 100µL da cultura foram transferidos para um novo tubo contendo 5mL de LBEDO, que foi incubado a 37°C por 2 horas sob agitação (250rpm). A seguir, foram adicionados 10µL do fago P22HT e as células foram novamente incubadas a 37°C sob agitação por 3 horas. Após esse período, algumas gotas de clorofórmio foram adicionadas e a preparação foi incubada por mais 10 minutos. Após a separação das fases, o sobrenadante foi recolhido, transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugado por 2 minutos a 14.000rpm (microcentrífuga 5415R/ rotor F45-24-11, Eppendorf). Novamente, o sobrenadante contendo o fago foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga e centrifugado por 30 minutos a 14.000rpm e a 4°C. Nesta fase, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o sedimento ressuspendido com 100µL de BS (Buffered Saline – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl). Foi adicionada uma gota de clorofórmio ao conteúdo do tubo para a estocagem da preparação de fago a 4°C.

3.5.15. Determinação do título do bacteriófago P22HT.

Inicialmente, a linhagem de *S. enterica* Typhimurium MST1761 (Maloy, 1996) foi inoculada em 3mL de meio LBEDO e incubada por 12 horas a 37°C sob agitação. Uma

alíquota de 200µL de cultura foi retirada e inoculada em 3mL de ágar semi-sólido TSBA (Tryptone broth-soft agar) aquecido a 50°C. A mistura foi então aplicada sobre placas de meio LA, para solidificação. Paralelamente, a preparação de fago P22HT (descrita no item anterior) foi diluída seriadamente em solução salina utilizando-se placas de microdiluição (Corning, Corning, NY - USA). Foram adicionados 45µL de solução salina (NaCl 0,85%) nas primeiras 9 fileiras da placa (10^{-1} a 10^{-9}). A seguir, 5µL do fago foi acrescentado na primeira coluna e homogeneizado. Após homogeneização, foi feita a diluição seriada transferindo-se 5µL da mistura para cada poço da placa. Foram aplicados 5µL das diluições 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} nas placas de LA que continham as células MST1761 e estas foram mantidas a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos para a adsorção do fago. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. A determinação do título de fago foi feita por contagem da quantidade de pontos de lise (cada ponto de lise corresponde a um fago). A determinação do número de unidades formadoras de placa (pfu) foi obtida utilizando-se da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número de placas de lise}}{5\mu\text{L} \times \text{fator de diluição}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{\text{mL}} = \text{Pfu}/\mu\text{L}$$

3.5.16. Transferência de plasmídios pYA3137 e pYA3137trcm2 para *S. enterica* Typhimurium por transdução generalizada com o bacteriófago P22HT.

O método de transdução generalizada foi empregado na transferência de plasmídios entre linhagens de *S. enterica*. Os plasmídios pYA3137trc e pYA3137trcm2 foram transferidos para *S. enterica* Typhimurium χ 3987, *S. enterica* Typhimurium χ 4550 e *S.*

enterica Typhimurium H683 por transdução generalizada utilizando o bacteriófago P22HT, um virion P22 modificado, capaz de promover altas frequências de transdução. Como doadora dos plasmídios pYA3137*trc* e pYA3137*trcm2* foi utilizada a linhagem χ 3987 previamente transformada por eletroporação.

A linhagem doadora foi crescida por 16 horas a 37°C sob agitação. No dia seguinte, foram adicionados 500 μ L desta cultura em tubo contendo bacteriófago P22HT diluído em 2mL de meio LBEDO. A mistura foi incubada a 37°C sob agitação durante 6 horas para que ocorresse a infecção. Após esse período, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 12.000rpm (microcentrífuga 5415R/ rotor F45-24-11, Eppendorf). O sedimento foi desprezado e o sobrenadante transferido para um novo tubo. A suspensão foi novamente centrifugada, o sedimento descartado e o sobrenadante transferido para um novo tubo e então filtrado (filtros de 0,22 μ m, Milipore, Billerica – MA, USA). Ao filtrado foram adicionadas algumas gotas de clorofórmio e essa preparação, contendo o fago carreando partes aleatórias do genoma da linhagem doadora, foi utilizada para infectar as linhagens receptoras dos plasmídios.

As linhagens receptoras χ 3987, χ 4550 e H683 foram crescidas em 5mL de meio LB com DAP por 12 horas a 37°C, sob agitação. Após esse período, as culturas foram centrifugadas por 2 minutos a 12.000rpm e a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos ressuspensos em 1mL de LB. As células foram novamente sedimentadas por centrifugação (mesmas condição anterior) e ressuspensas em 1mL de LB. Diferentes alíquotas de células foram transferidas para tubos de microcentrífuga e diferentes alíquotas do fago originário da infecção da linhagem doadora χ 3987 contendo os plasmídios pYA3137 e pYA3137*trcm2* foram adicionadas às células receptoras. As preparações foram misturadas e incubadas por 15 minutos a 37°C e plaqueadas em LA. As placas foram

incubadas por 16-18 horas a 37°C para a visualização das colônias e posterior seleção dos recombinantes.

3.6. Caracterização das linhagens vacinais.

3.6.1. Sorologia para *Salmonella*.

Para confirmar a composição antigênica das linhagens de *S. enterica*, foi feita a sorologia através da técnica de aglutinação em lâmina, utilizando-se sistema comercial (PROBAC, São Paulo, Brasil) composto de:

- Soro *Salmonella* Polivalente: contém anticorpos contra os antígenos O dos grupos A, B, C, D e E, contra os antígenos Vi e antígenos flagelares a; b; c; d; i; 1,2,5.
- Soro *Salmonella* Polivalente Somático: contém anticorpos contra o antígeno O de *Salmonellas* do grupo A, B, C, D e E.
- Soro *Salmonella* Polivalente Flagelar: contém anticorpos contra os antígenos H: a; b; c; d; i; 1,2,5

3.6.2. Teste fenotípico para as mutações $\Delta cya \Delta crp$ e $\Delta aroA \Delta aroD$.

Mutantes $\Delta cya \Delta crp$ são incapazes de metabolizar algumas fontes de carbono. Mutantes $\Delta aroA \Delta aroD$ são incapazes de sintetizar alguns aminoácidos aromáticos essenciais. Para confirmar estes fenótipos nas linhagens vacinais de *S. enterica* Typhimurium e descartar a ocorrência de revertentes, foi feita a análise do padrão de fermentação produzido pela deleção nos genes *cya* e *crp* através da utilização de diferentes fontes de carbono. O teste foi feito conforme descrito em Curtiss & Kelly (1987). As

linhagens χ 3987pYA3137trc, χ 3987pYA3137trcm2 e χ 4550pYA3137trc e χ 4550pYA3137trcm2 foram plaqueadas em meio MacConkey suplementado com 1% de glicose ou maltose e a capacidade de utilização de uma ou outra fonte de carbono foi analisada pela acidificação do meio. A análise da deleção dos genes *aroA* e *aroD* foi feita através da ausência de crescimento das linhagens H683pYA3137 e H683pYA3137trcm2 em meio mínimo sem suplementação de aminoácidos.

3.7. Análise da expressão de *m2* em linhagens de *S. enterica* Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683.

3.7.1. Extração de proteínas totais.

Para verificar a expressão do domínio M2 em linhagens de *S. enterica* Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683, primeiramente foi feito o preparo das proteínas totais. A metodologia utilizada foi basicamente a descrita por Sambrook e Russel (2001), com algumas modificações, devido ao caráter insolúvel da proteína. As linhagens transduzidas com o fago P22HT e carreando os plasmídios pYA3137trc e pYA3137trcm2 foram cultivadas em 5ml de meio LB por 16 horas a 37°C, sob agitação. Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação a 12.000rpm por 2 minutos (microcentrífuga 5415R/ rotor F45-24-11, Eppendorff). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em tampão de lise celular (NaH₂PO₄ 100mM; Tris-HCl 10mM; Uréia 8M) e incubado por 16 horas sob agitação. Em seguida, a suspensão foi passada em uma seringa de 1mL por várias vezes e os restos celulares foram sedimentados por centrifugação (12.000rpm por 5 minutos). Sedimento e sobrenadante foram separados e misturados a 100 μ L de tampão de amostra (Tris-HCl pH 6.8 0,09M; SDS 2%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,02%; DTT 0,1M). A

mistura foi fervida por 5 minutos a 80°C. As proteínas extraídas foram quantificadas pelo método de BRADFORD (Bradford, 1976) e, em seguida, estocada a -20°C para posterior análise por SDS-PAGE.

3.7.2. Análise eletroforética do perfil protéico de *S enterica* Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683 recombinantes.

As análises eletroforéticas foram feitas em gel unidimensional de poliacrilamida a 15%, em condições denaturantes, em sistema Mini Protean 3 Cell – Vertical Gel Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Hercules – CA, USA). Neste experimento, o perfil eletroforético das linhagens de *S. enterica* Typhimurium χ 3987pYA3137trcm2, χ 4550pYA3137trcm2 e H683pYA3137trcm2 foi avaliado e comparado com as linhagens não produtoras de M2, contendo o plasmídeo pYA3137trc. A corrida eletroforética ocorreu a 80-120mA, 200V. Após a corrida, os géis foram incubados em solução fixadora por 2 horas e em seguida corados com Coomassie blue R250 (Bio-Rad, Richmond – CA, USA), conforme descrito em Sambrook e Russel (2001). Para inferir a massa molecular das bandas protéicas foi utilizado o marcador de peso molecular para proteínas Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, (Fermentas – UE).

3.7.3. Detecção de M2 por *immunoblott*.

Prosseguindo as análises de expressão de M2 pelas linhagens recombinantes, foi feito o experimento de *immunoblott*, na qual as proteínas separadas por SDS-PAGE foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond™ C extra membrane, GE Healthcare). A transferência ocorreu a 85-135mA e 150V por 2 horas a temperatura ambiente, em cuba contendo tampão de transferência (Mini Protean 3 Cell – Vertical Gel

Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories, Hercules – CA, USA). As interações inespecíficas foram bloqueadas com PBS contendo Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St.Louis-MO, USA) e 0,1% e leite desnatado a 3% (PBS-Triton-Leite) por 40 minutos. A membrana contendo as proteínas transferidas foi colocada em contato com soro de camundongo contendo anticorpo policlonal anti MAEBL, obtido pelo Laboratório do Professor Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa, diluído 1:1000 em solução de PBS-Triton-leite por 16 horas. Após algumas lavagens da membrana com a mesma solução, esta foi incubada com soro anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, St.Louis- MO, USA), na diluição 1:2000, por 1 hora. A membrana foi novamente lavada com PBS e Triton (0,1%), seguida de uma lavagem com PBS e Triton (0,5%) e uma última lavagem de 30 minutos com solução Tris-HCl (0,05M pH 6,8). Em seguida, a reação foi revelada utilizando uma solução Tris-HCl contendo o substrato peróxido de hidrogênio (30%) e o cromógeno 4-cloro 1-naftol a 0,3% (Acros Organics - Bélgica). A reação foi parada por várias lavagens com água destilada. A posição da banda referente a M2 (aproximadamente 45KDa) foi confirmada com a ajuda do marcador de peso molecular para proteínas Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, (Fermentas – UE). O experimento foi feito segundo protocolo descrito em Sambrock e Russel, (2001).

3.8. Curva de Crescimento *in vitro* das linhagens de *S. enterica* Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683 recombinantes.

Para verificar se a proteína heteróloga M2, quando expressa por *S. enterica* Typhimurium, poderia de alguma maneira interferir no crescimento bacteriano, a curva de crescimento das linhagens de *S. enterica* foi avaliada *in vitro*. Para isso, foi feito um pré-inóculo de *S. enterica* Typhimurium χ 3987pYA3137trc, χ 4550pYA3137trc e

H683pYA3137trc (controles) e *S. enterica* Typhimurium χ 3987pYA3137trcm2 χ 4550pYA3137trcm2 e H683pYA3137trcm2 (linhagens vacinais) em meio LB, que foi incubado sob agitação por 16 horas a 37°C. Após esse período, 1mL das culturas foi transferido para 100mL de meio LB e estas novas culturas foram crescidas a 37°C sob agitação. A cada 2 horas, alíquotas de 100 μ L foram retiradas, diluídas em 900 μ L de salina (0,85%) até a diluição 10⁻⁸ e então plaqueadas em triplicata em meio MacConkey pelo método de gota (Barbosa *et al.*, 1995). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas e as UFC (Unidades Formadoras de Colônias) foram contadas.

3.9. Cultivo e preparo de células de *S. enterica* Typhimurium para inoculação em camundongos BALB/c/AnUnib.

O cultivo e preparo das células recombinantes utilizadas para infecção oral em camundongos foram realizados conforme descrito por Covone *et al.* (1998). As linhagens χ 3987, χ 4550 e H683 contendo os plasmídios pYA3137trc e pYA3137trcm2 foram inoculadas em 5mL de LB acrescido de glicose na concentração (0,1%) e incubadas por toda a noite a 37°C. No dia seguinte, 1mL de cada cultura foi transferido para 100mL de LB com glicose (1%) e as novas culturas foram incubadas a 37°C sob agitação até atingir a densidade óptica (DO) de 0,7nm a um comprimento de onda de 600nm. Após atingir essa DO, as células foram sedimentadas por centrifugação a 5.000rpm por 5 minutos (centrífuga 5804R/rotor F34-6-38, Eppendorf), os sobrenadantes descartados e as células ressuspensas em 10mL de solução salina (0,85%). Uma alíquota de cada suspensão foi separada para o procedimento de infecção oral. Do restante, foram retiradas alíquotas de 100 μ L e feitas diluições seriadas até a diluição 10⁻⁸ que foram plaqueadas em triplicata em agar

MacConkey, pelo método de gota (Barbosa *et al.*, 1995), para a posterior determinação da UFC.

3.10. Experimentos *in vivo*.

3.10.1. Estabilidade das linhagens recombinantes vacinais de *S. enterica* Typhimurium *in vivo*: persistência nos órgãos de camundongos BALB/c/AnUnib.

A capacidade das linhagens recombinantes de *S. enterica* Typhimurium de invadir e persistir nos tecidos animais foi determinada pelo experimento de persistência. O protocolo utilizado foi o descrito por Covone *et al.* (1998).

Foram formados dois grupos experimentais contendo 9 camundongos BALB/c/AnUnib fêmeas com sete semanas de idade. O grupo I foi inoculado com *S. enterica* Typhimurium pYA3137*trc* e o grupo II, com *S. enterica* Typhimurium pYA3137*trcm2*. Os camundongos receberam, por via intraesofágica, uma única dose de 100µL das suspensões bacterianas (aproximadamente 10⁹ UFC/mL). Os animais foram privados de água e comida por aproximadamente 4 horas antes do inóculo e aproximadamente 2 horas após o inóculo (Karem *et al.*, 1995). Grupos de três animais foram sacrificados após 5, 15 e 25 dias da infecção e as placas de Peyer e baço, recolhidos para o estudo da persistência. Os órgãos foram pesados e homogeneizados em 2mL de salina (0,85%) com o homogeneizador Omni Mixer Homogeneizer 04728-00 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA). Alíquotas de 100µL foram retiradas de cada macerado e diluídas seriadamente. Cada diluição foi plaqueada em triplicata em ágar MacConkey, pelo método de gota (Barbosa *et al.*, 1995). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas e, no dia

seguinte, as colônias foram contadas para a determinação da UFC total recuperada de cada órgão. Aproximadamente 30 colônias reisoladas aleatoriamente dos tecidos foram testadas por PCR quanto à presença de *m2* e por *immunoblott* quanto à expressão da proteína.

3.10.2. Imunização oral de camundongos BALB/c/AnUnib com a linhagem recombinante vacinal de *S. enterica* Typhimurium H683.

Para a imunização oral foram formados três grupos experimentais de camundongos, cada um com oito animais. O grupo I recebeu apenas PBS, o grupo II foi imunizado com *S. enterica* Typhimurium H683pYA3137*trc* (grupo controle) e o grupo III foi imunizado com *S. enterica* Typhimurium H683pYA3137*trcm2* (grupo vacinal). Os camundongos, entre 6 e 8 semanas de idade, foram inoculados com 100µL das suspensões bacterianas (aproximadamente 10⁹ UFC) via intraesofágica, com a ajuda de seringa de 1mL (BD Medical, Franklin Lakes – NJ, USA) e agulha de gavagem própria para camundongos IC 800 (Insight Equipamentos, Brasil). Foram feitas duas imunizações com intervalo de 14 dias entre elas.

3.11. Análise da resposta imune induzida.

3.11.1. Coleta e processamento do soro de camundongos BALB/c/AnUnib imunizados.

Para o processamento do soro a ser utilizado na titulação de anticorpos séricos anti M2 e anti *Salmonella*, o sangue dos animais imunizados foi recolhido a partir da região subocular, no plexo retroorbital. A coleta foi feita a partir da segunda semana após a segunda

dose de imunização, durante um intervalo de quatro semanas. Os animais foram anestesiados em éter etílico e, com a ajuda de uma pipeta Pasteur (Corning, Corning – NY, USA), aproximadamente 500µL de sangue foram coletados de cada animal. Para processamento do soro, o sangue foi incubado a 37°C por 2 horas para a coagulação e, a seguir, a 4°C por 1 hora até a retração do coágulo. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 1.500rpm e 4°C (microcentrífuga 5415R/rotor F45-24-11, Eppendorf). O soro resultante foi transferido para tubos de microcentrifugação novos e armazenado a -20°C.

3.11.2. Coleta e processamento de material fecal de camundongos BALB/c/AnUnib imunizados.

Para a titulação de anticorpos de mucosa anti M2 e anti *Salmonella*, foi coletado o material fecal de cada animal. A coleta foi feita a partir da segunda semana após a segunda dose de imunização, durante um intervalo de quatro semanas. Os animais permaneceram em caixa plástica estéril sem maravalha até 2 a 3 pellets fecais de cada animal serem recolhidos e imediatamente transferidos para tubos de microcentrifugação contendo uma solução de PBS com 1mM PMSF e 1% BSA (USB Corporation, Cleveland, OH – USA) (Roberts *et al.*, 1998). Os tubos foram incubados por toda a noite a 4°C. No dia seguinte, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 14.000rpm por 2 minutos (microcentrífuga 5415R/rotor F45-24-11, Eppendorf). O sobrenadante foi transferido para tubos novos e armazenado a -20°C.

3.11.3. Preparação de antígenos de *S. enterica* Typhimurium H683 para ELISA.

Os antígenos de *S. enterica* Typhimurium H683 foram preparados conforme descrito por Fayolle *et al.* (1994). A linhagem H683pYA3137*trc* foi crescida em 500mL de meio LB por 16-18 horas a 37°C, sob agitação. No dia seguinte, as bactérias foram centrifugadas (microcentrífuga 5415R/rotor F45-24-11, Eppendorf) e ressuspendidas em PBS, na concentração final de aproximadamente 3×10^{11} UFC/mL. A suspensão bacteriana foi submetida a aquecimento de 80°C por 10 minutos para matar as bactérias e a preparação contendo os antígenos brutos de *Salmonella* foi aliquoteada e estocada a -20°C.

3.11.4. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA).

A resposta imune humoral e de mucosa desenvolvida para antígenos de *S. enterica* Typhimurium e para o domínio M2 foi determinada através do título de anticorpos IgG e IgA específicos presentes no soro e material fecal dos animais imunizados, através da técnica de ELISA. Os ensaios foram feitos conforme descrito por Pizza *et al.* (1994) e Di Tommaso *et al.* (1996), com algumas modificações. Em todos os experimentos foram utilizadas placas de 96 poços de média afinidade (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany).

3.11.4.1. Detecção da IgG sérica anti-M2 e anti *Salmonella*.

Para detectar IgG presente no soro dos camundongos, as placas foram sensibilizadas com 100µL (25µg/mL) por poço de antígeno bruto de *S. enterica* Typhimurium ou 0,1µg da proteína MAEBL purificada diluídos em tampão carbonato (0,05M pH 9,6) e incubadas por 2 horas a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de PBS e Tween 20 (0,05%) (LGC Bio, UE) três vezes consecutivas e depois incubadas por 2 horas 37°C com

200µL por poço de solução bloqueadora (PBS, Molico 3%, BSA 2,5%). A solução bloqueadora foi descartada. Diluições seriadas dos soros de camundongos BALB/c/AnUnib foram adicionadas, para um volume final de 100µL, à solução bloqueadora e as placas incubadas por toda a noite a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução de PBS Tween 20 (0,05%) por quatro vezes consecutivas e, a seguir, foram incubadas por 2 horas a 37°C com 100µL de anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, St.Louis- MO, USA), diluído 1:2000 em solução bloqueadora. As placas foram novamente lavadas com solução de PBS Tween 20 (0,05%) por quatro vezes. Para a revelação dos resultados, foi adicionado a cada poço das placas o substrato enzimático o-fenilenediamina (OPD) (Sigma-Aldrich, St.Louis- MO, USA) (10mg/mL) e H₂O₂ a 0,03% (v/v) diluídos em tampão fosfato-citrato. Após 30 minutos de incubação, a reação foi interrompida com 50µL de H₂SO₄ 4N e a DO₄₉₂ foi lida em espectrofotômetro de UV-vis para placas (Bio-Rad Laboratories, Hercules – CA, USA).

3.11.4.2. Detecção da IgA de mucosa anti M2 e anti *Salmonella*.

Para a detecção de IgA nos materiais fecais, as placas foram sensibilizadas com 100µL (25µg/mL) por poço de antígeno bruto de *S. enterica* Typhimurium ou 0,1µg da proteína MAEBL purificada diluídos em tampão carbonato (0,05M pH 9,6) e incubadas por 16 horas a temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas nas mesmas condições descritas no item anterior. Diluições seriadas do material fecal dos camundongos BALB/c/AnUnib foram adicionadas, para um volume final de 50µL, à solução bloqueadora e as placas incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas como descrito anteriormente e a seguir, foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com 100µL de anticorpos anti-IgA de camundongo conjugado com

peroxidase (Sigma-Aldrich, St.Louis- MO, USA) diluído 1:2000. As placas foram lavadas e os resultados revelados com a adição de OPD e H₂O₂, nas condições descritas anteriormente. A reação foi interrompida com 50µL de H₂SO₄ 4N após 15 minutos de incubação e a DO₄₉₂ foi lida em espectrofotômetro de UV-vis para placas (Bio-Rad Laboratories, Hercules – CA, USA).

3.11.5. Determinação do título de anticorpos.

Para determinar o título de anticorpos específicos, foram considerados valores de DO₄₉₂ nm maiores que o pré-imune e maiores que 0,1.

3.11.6. Desafio de animais imunizados frente à infecção por *Plasmodium yoelii* e análise da evolução da parasitemia.

Para o experimento de desafio, camundongos BALB/c/AnUnib entre 6 e 8 semanas de idade foram separados em grupos experimentais de 7 animais e imunizados exatamente como descrito no item 3.9.3.1. Vinte e um dias após a segunda dose de imunização, os animais foram desafiados com 10⁵ eritrócitos infectados com *P. yoelii* inoculados via intraperitoneal. Esses animais foram acompanhados durante sete dias para a análise da taxa de sobrevivência e possível redução da parasitemia. A evolução da parasitemia foi analisada diariamente a partir do quarto dia após o desafio em lâminas de esfregaços sanguíneos corados por Giemsa, coletados da ponta da cauda dos animais infectados. Para a determinação da parasitemia, foram analisados, por microscopia ótica (aumento de 1000x), 400 eritrócitos por lâmina e a porcentagem de eritrócitos infectados foi quantificada.

3.12. Análises estatísticas.

Os resultados de curva de crescimento, persistência, títulos de anticorpos específicos calculados e parasitemia foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA, calculado com o programa Origin 7.0 (Origin Lab Corp) e probabilidades inferiores a 5% foram consideradas significativas ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS.

4.1. Construção dos vetores e linhagens.

4.1.1. Amplificação e clonagem do domínio M2 do gene *maebl* de *Plasmodium yoelii*.

Para a construção do vetor de expressão carreando o domínio M2 do gene *maebl* de *P. yoelii*, inicialmente foram realizadas amplificações por PCR da região nucleotídica codificadora para o domínio M2, utilizando-se como molde o plasmídeo pIgSPm2, construído pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa (dados não publicados), que contém a sequência de aproximadamente 1.2 kb do gene *maebl* de *P. yoelii*. Os iniciadores utilizados foram desenhados de modo a preservar a fase de leitura do gene, incluindo a região codificadora do epítipo T CD8⁺, localizada logo no início da sequência de M2. Os iniciadores utilizados permitiram gerar fragmentos flanqueados com sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Sal*I para a subsequente clonagem no vetor de expressão pYA3137*trc* (Sanches, 2002) (Figura 3).

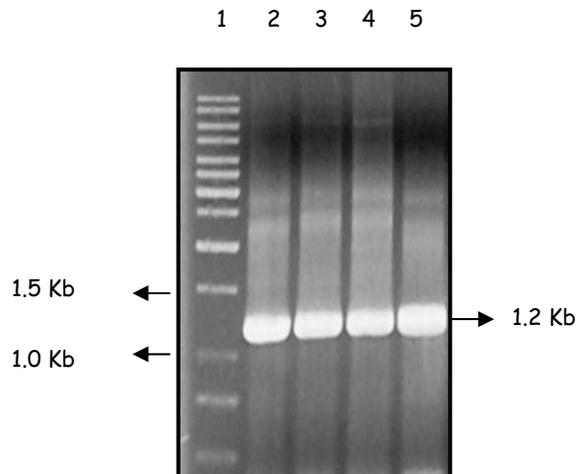


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose (1%) demonstrando o fragmento de DNA (1,2 Kb) gerado pela amplificação por PCR da região *m2* do gene *maebl*. 1: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas), 2 a 5: *m2* amplificado.

Com o intuito de gerar um número de fragmentos adequado para a clonagem no vetor de expressão pYA3137*trc* e, para detectar a presença dos sítios de restrição, após a amplificação, os produtos da PCR foram purificados do gel de agarose e clonados no vetor pGEM-T (Promega) (Figura 4). O produto da ligação do gene *m2* com o plasmídeo pGEM-T foi então transformado em células de *E. coli* DH5 α . Os clones recombinantes foram isolados em placas de LB acrescidas de ampicilina, já que o vetor pGEM-T contém o gene de resistência a esse antibiótico. Para confirmar a presença do plasmídeo em *E. coli* foi feita a sua extração e o mapa de restrição dos clones obtidos foi avaliado por digestão enzimática com *Bam*HI e *Sal*I, demonstrando a eficiência da clonagem pela detecção do fragmento de 1,2 kb e a funcionalidade dos sítios de restrição, criando assim, as condições para a clonagem no vetor de expressão. O plasmídeo recombinante obtido foi denominado pGEM-T*m2*. A

digestão enzimática proporcionou a visualização em gel de agarose de 2 bandas distintas, de 3,0 kb e de 1,2 kb, correspondentes à sequência do plasmídio e de *m2*, respectivamente (Figura 5).

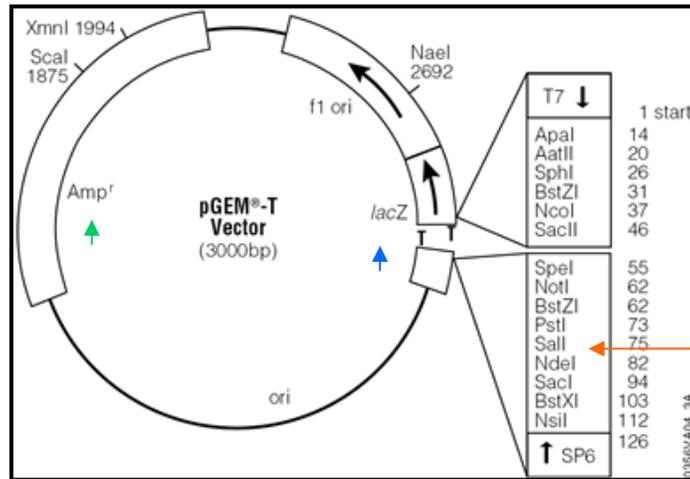


Figura 4: Mapa ilustrando o plasmídeo pGEM-T (fonte: www.promega.com). A seta verde indica o gene de resistência à ampicilina e a seta vermelha indica o sítio múltiplo de clonagem, onde o fragmento *m2* do gene *maebl* foi inserido.

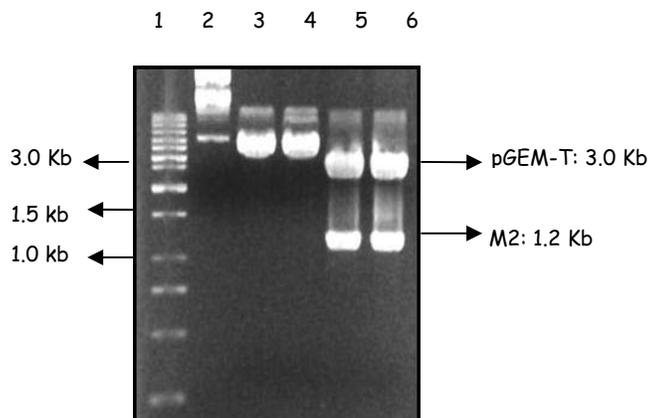


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a restrição enzimática do plasmídeo pGEM-Tm2. 1: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas), 2: plasmídeo pGEM-T, 3: plasmídeo pGEM-Tm2 digerido com *Bam HI*, 4: plasmídeo pGEM-Tm2 digerido com *Sall*, 5: restrição enzimática de pGEM-Tm2 com as enzimas *BamHI* e *Sall*, resultando em 2 fragmentos de tamanhos referentes ao inserto (1,2 kb) e ao plasmídeo linearizado (3,0 kb, aproximadamente).

Para confirmar a integridade do fragmento *m2* inserido no plasmídeo pGEM-T e assegurar a inexistência de mutações no fragmento utilizado para a expressão deste domínio de MAEBL, incluindo o descarte de mutações na região codificante para o epítipo T CD8⁺, o plasmídeo pGEM-Tm2 foi sequenciado e comparado com a sequência de nucleotídeos de *maebl* depositada no GenBank (acesso número 34495214) (Figura 6). Como pode ser observado, o fragmento sequenciado demonstrou 100% de similaridade com a sequência de *m2*.

```

CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment
-----CTTAAC 6
GCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTGCGCGGATCCATGCTTAAAC
*****

AAATATATGAAATCTAATGTTGAACTTCCATATGAAAAAAGTGGGTTAGCTATGCATCAT 66
AAATATATGAAATCTAATGTTGAACTTCCATATGAAAAAAGTGGGTTAGCTATGCATCAT
*****

GGTGATTTAAGTGATGCCCCAAATCTTGGGATGAAGAAAATTTGTATAAAAAAATAGA 126
GGTGATTTAAGTGATGCCCCAAATCTTGGGATGAAGAAAATTTGTATAAAAAAATAGA
*****

GATTATAATTATGATATGTGCAAAGCACTGTAATGAAATCGACTATAACCATTGAAAATG 186
GATTATAATTATGATATGTGCAAAGCACTGTAATGAAATCGACTATAACCATTGAAAATG
*****

TTTGATTATAAACTAAAAACTGTTATATTTTGGTCTTTATGGTTTAGGGGGCGATTG 246
TTTGATTATAAACTAAAAACTGTTATATTTTGGTCTTTATGGTTTAGGGGGCGATTG
*****

GGATCTAATATTTCAAAGTAAAAATATATTTAAATCACAGCCAAATAACATAACATTA 306
GGATCTAATATTTCAAAGTAAANAATATATTTAAATCACAGCCAAATAACATAACATTA
*****

CCAATGTTTAAATCCATCATCAATAAAAAATTTACTTGATTGTTTCATTATATAGTTATTGT 366
CCAATGTTTAAATCCATCATCAATAAAAAATTTACTTGATTGTTTCATTATATAGTTATTGT
*****

TTAGGTCCATGCCTGGAAAATGCATATAATAATAAATGTTTCCGTAGTCTGCCTGCATAT 426
ATAGGTCCATGCCTGGAAAATGCATATAATAATAAATGT----- 459
*****

```

Figura 6: Alinhamento entre a sequência do fragmento *m2* do gene *maebl* clonado no plasmídeo pGEM-T (em vermelho) e a respectiva sequência disponível no GenBank.

Uma vez confirmada a clonagem em pGEM-T, o fragmento *m2* digerido (*Bam*HI e *Sal*II) foi purificado para posterior clonagem em plasmídeo para a expressão estável do domínio M2. O vetor de expressão utilizado foi o plasmídeo pYA3137*trc*, um plasmídeo de alto número de cópias pertencente ao sistema letal balanceado *asd* (Curtiss e Kelly, 1989). O sistema de expressão foi construído de forma que a transcrição de *m2* estivesse sob controle do promotor constitutivo *trc* (Figura 7). Para receber o inserto, o plasmídeo pYA3137*trc* (Sanches, 2002) foi submetido à restrição enzimática com as mesmas enzimas *Bam*HI e

SalI, criando sítios complementares aos presentes no fragmento, possibilitando a clonagem. Após a ligação, pYA3137*trcm2* foi transformado por choque térmico em *E. coli* χ 6212, uma linhagem que apresenta alta frequência de transformação, para que fosse replicado. Para a confirmação da transformação, o plasmídeo foi extraído e alguns clones escolhidos e digeridos com *BamHI* e *SalI*, proporcionando a visualização em gel de agarose de 2 bandas, de 4,0 kb e de 1,2 kb, correspondentes ao plasmídeo pYA3137*trc* e ao fragmento *m2*, respectivamente (Figura 8).

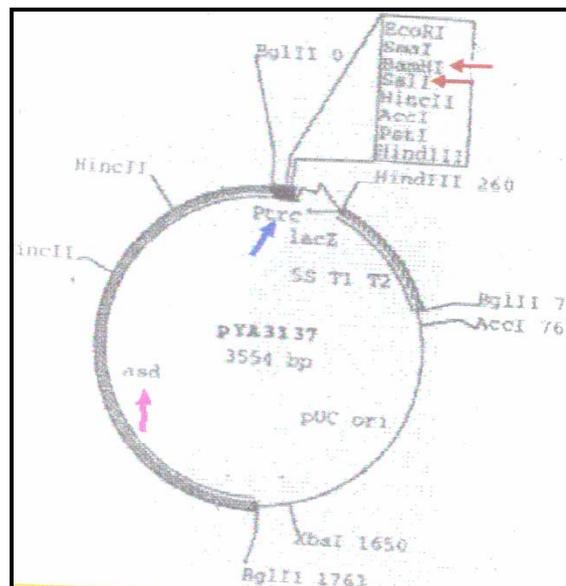


Figura 7: Mapa do plasmídeo pYA3137 (fonte: Curtiss & Kelly, 1987). A seta rosa indica o gene *asd*, que codifica para o ácido diaminopimélico (DAP), um aminoácido importante na constituição da parede celular de bactérias gram-negativas. A seta azul indica o promotor constitutivo *trc* e, as setas vermelhas, indicam onde o gene *m2* foi inserido.

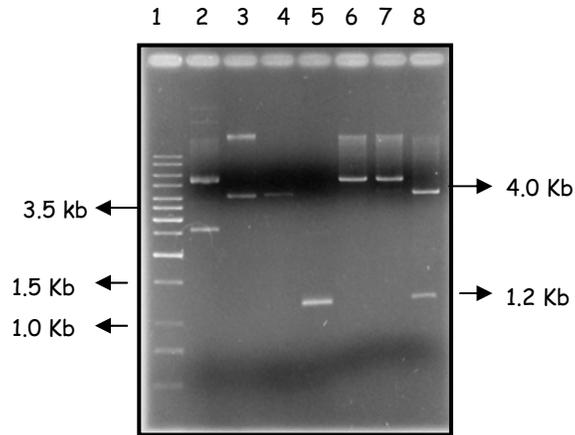


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 0,8% demonstrando a confirmação da clonagem do fragmento *m2* no plasmídio pYA3137*trc* através de restrição enzimática do plasmídio pYA3137*trcm2* extraído de *E. coli* χ 6212. 1: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA *Ladder* (Fermentas); 2: plasmídio pYA3137*trc*; 3: plasmídio pYA3137*trcm2*; 4: pYA3137*trc* digerido com as enzimas *Bam*HI e *Sal*I; 5: inserto *m2* purificado; 6: pYA3137*trcm2* digerido com *Bam*HI; 7: pYA3137*trcm2* digerido com *Sal*I; 8: pYA3137*trcm2* digerido com *Bam*HI e *Sal*I.

4.1.2. Transformação de *S. enterica* Typhimurium com pYA3137*trcm2*.

O plasmídio pYA3137*trcm2*, inicialmente selecionado em *E. coli* χ 6212, foi purificado e utilizado para transformar a linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium χ 3987, bem como o plasmídio pYA3137*trc*, que foi utilizado como controle nos experimentos de curva de crescimento, expressão e imunização, descritos mais adiante. A partir dessa linhagem de *S. enterica*, os plasmídios pYA3137*trcm2* e pYA3137*trc* foram transferidos para as linhagens de *S. enterica* Typhimurium χ 4550, H683 e novamente para χ 3987 por transdução generalizada mediada pelo bacteriófago P22HT. Para comprovar a transformação através da detecção dos plasmídios pYA3137*trcm2* e pYA3137*trc*, foram realizadas a extração plasmidial e a digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Sal*I

(dados não mostrados). Os plasmídios recuperados de colônias selecionadas foram também testados quanto à presença do fragmento de *m2* por PCR (Figura 9).

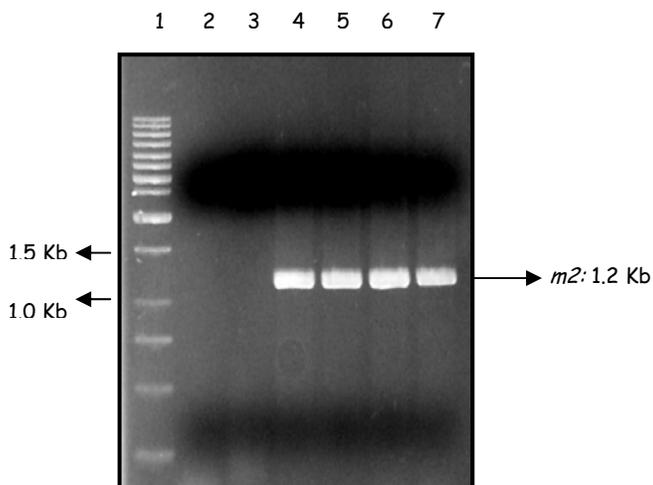


Figura 9: Gel de agarose 1% demonstrando produtos de PCR gerados com os iniciadores *M2f* e *M2r* quando plasmídios recuperados de colônias das linhagens χ 4550, χ 3987 e H683 contendo o plasmídio pYA3137trcm2 foram utilizados como molde. 1: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas), 2: controle negativo da reação sem molde, 3: controle negativo da reação pYA3137trc, 4: controle positivo da reação (amplificação de *m2* a partir de pIgSPm2), 5: amplificação de *m2* a partir de pYA3137trcm2 extraído de *S. enterica* Typhimurium χ 3987, 6: amplificação de *m2* a partir de pYA3137trcm2 extraído de *S. enterica* Typhimurium χ 4550, 7: amplificação de *m2* a partir de pYA3137trcm2 extraído de *S. enterica* Typhimurium H683.

4.2. Caracterização das linhagens vacinais: sorologia para *Salmonella* e teste fenotípico para as mutações Δ *cya* Δ *crp* e Δ *aroA* Δ *aroD*.

A sorologia para *Salmonella*, feita pela técnica de aglutinação em lâmina utilizando soro contra antígenos flagelares e somáticos foi realizada contra todas as linhagens de *S.*

enterica Typhimurium utilizadas para abrigar os plasmídios pYA3137*trc* e pYA3137*trcm2*. O resultado foi positivo para os antígenos somáticos e flagelares em todas as linhagens testadas (dados não mostrados).

Em todos os testes fenotípicos realizados para confirmar a atenuação das linhagens utilizadas como vetores vacinais, o fenótipo se comportou de acordo com o esperado, ou seja, as linhagens χ 3987 e χ 4550 foram capazes de fermentar a glicose, mas não a maltose, quando avaliadas em meio Agar MacConkey contendo estes açúcares, e a linhagem H683 não cresceu em meio mínimo sem a adição de aminoácidos aromáticos.

4.3. Avaliação da expressão de M2 nas linhagens de *S. enterica* Typhimurium.

A verificação da expressão do domínio protéico M2 nas linhagens de *S. enterica* Typhimurium χ 3987pYA3137*trcm2*, χ 4550 pYA3137*trcm2* e H683 pYA3137*trcm2* após a transferência do plasmídio pYA3137*trcm2* por transdução, foi feita por SDS-PAGE e *immunoblott*.

As proteínas totais das linhagens recombinantes foram extraídas e separadas em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). O perfil protéico das linhagens contendo o plasmídio pYA3137*trc* foi então comparado com o perfil de proteínas totais obtido das linhagens contendo o plasmídio pYA3137*trcm2*, o que revelou a presença de uma banda extra de 45 kDa nestas últimas, correspondente ao domínio M2 (Figura 10A). Essa mesma banda foi detectada por *immunoblott* usando anticorpos específicos para a proteína MAEBL (Figura 10B).

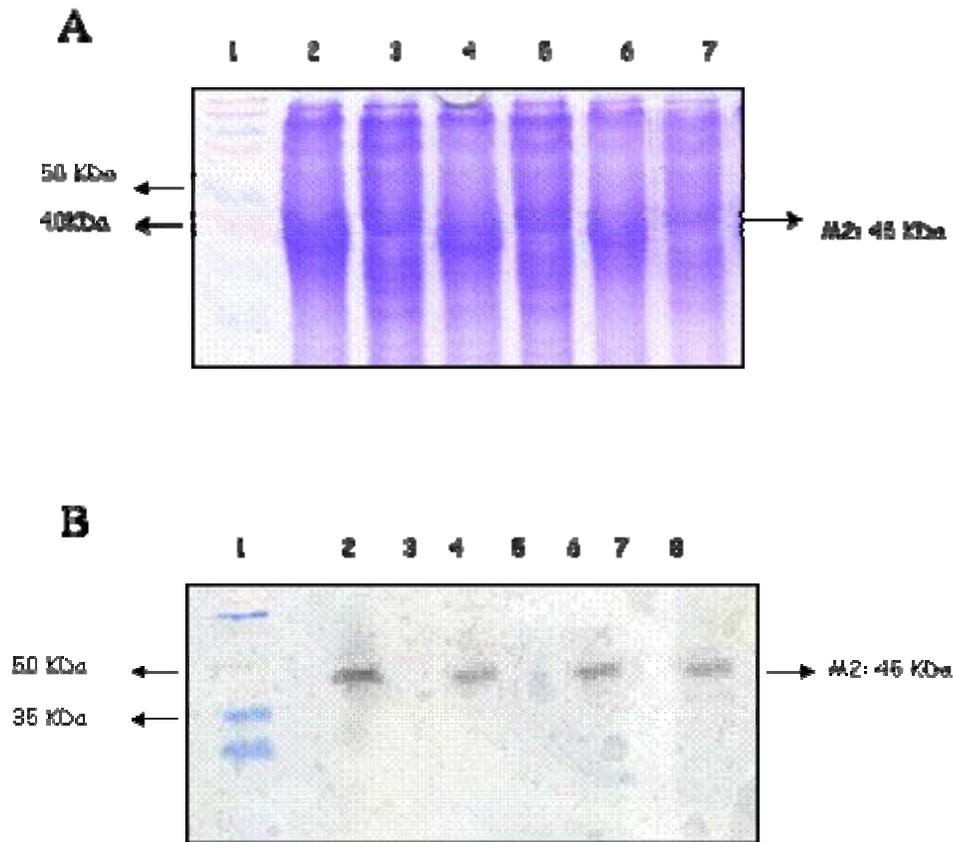


Figura 10: Análise da expressão de M2 nas linhagens de *S. enterica* Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683. A: Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) após coloração com Coomassie Brilliant Blue G, em condições denaturantes (2-mercaptoetanol). 1: marcador de peso molecular para proteínas Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, (Fermentas – UE); 2: *S. enterica* Typhimurium χ 3987pYA3137trc; 3: *S. enterica* Typhimurium χ 3987pYA3137trcm2; 4: *S. enterica* Typhimurium χ 4550 pYA3137trc; 5: *S. enterica* Typhimurium χ 4550 pYA3137trcm2; 6: *S. enterica* Typhimurium H683pYA3137trc; 7: *S. enterica* Typhimurium H683 pYA3137trcm2. B: Immunoblott utilizando soro policlonal (1:1000) anti- M2. 1: marcador de peso molecular; 2: controle positivo – proteína M2 purificada; 3: *S. enterica* Typhimurium χ 3987pYA3137trc; 4: *S. enterica* Typhimurium χ 3987pYA3137trcm2; 5: *S. enterica* Typhimurium χ 4550 pYA3137trc; 6: *S. enterica* Typhimurium χ 4550 pYA3137trcm2; 7: *S. enterica* Typhimurium H683pYA3137trc; 8: *S. enterica* Typhimurium H683 pYA3137trcm2.

4.4. Curva de Crescimento *in vitro*.

Para verificar a toxicidade do domínio protéico M2 para as linhagens de *S. enterica* Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683, fato que poderia interferir no crescimento das linhagens e conseqüentemente na expressão do antígeno, a curva de crescimento *in vitro* foi analisada e comparada com as mesmas linhagens contendo o plasmídio pYA3137*trc* (controle). Os dados foram expressos em unidades formadoras de colônia em função do tempo (UFC x tempo) e comparados com resultados de crescimento das linhagens controle, ambas cultivadas em meio LB a 37°C, sob agitação. Alíquotas de 100 μ L foram retiradas cada 2 horas, diluídas e plaqueadas. As placas foram incubadas a 37° C por 16 horas e as UFC foram determinadas. Os resultados estão demonstrados na Figura 11. Todas as linhagens construídas abrigando *m2* apresentaram um padrão de crescimento semelhante ao das respectivas linhagens controle, demonstrando que a presença da proteína M2 não interferiu no crescimento desses organismos *in vitro*.

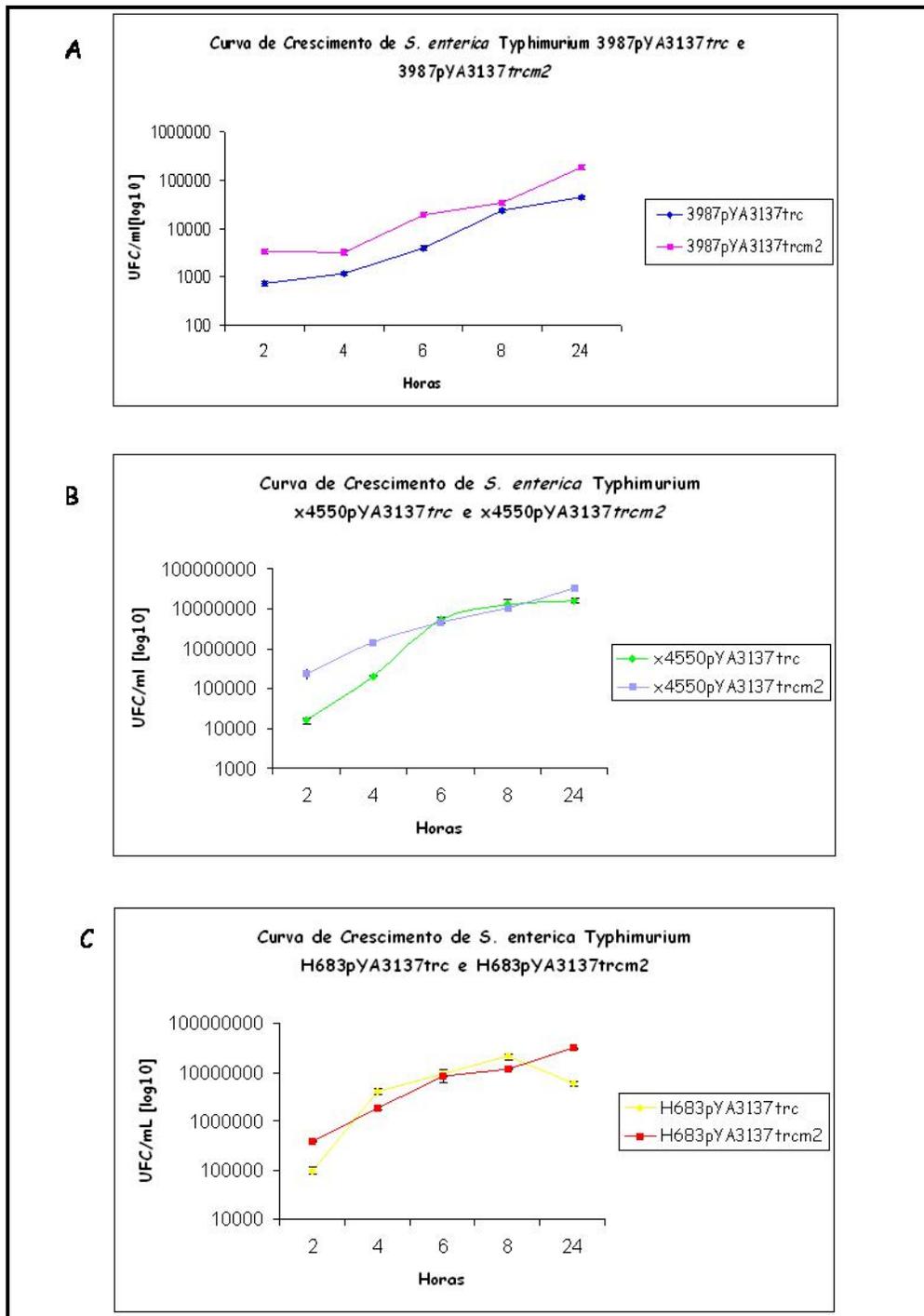


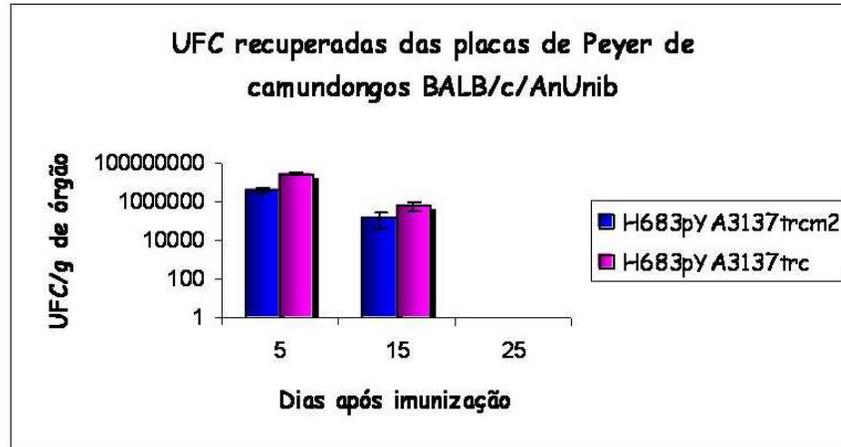
Figura 11: Gráficos demonstrando a curva de crescimento *in vitro* das linhagens *S. enterica* Typhimurium χ 3987 (A), χ 4550 (B) e H683 (C) contendo os plasmídios pYA3137trc ou pYA3137trcm2 expressos pelos números de UFC por horas. A expressão de *m2* não afeta o crescimento das linhagens recombinantes. As diferenças não foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

4.5. Persistência das linhagens vacinais de *S. enterica* Typhimurium.

Para verificar a influência da expressão de M2 no crescimento *in vivo* e determinar a capacidade das linhagens vacinais recombinantes de *S. enterica* Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683 de invadir e persistir nos tecidos animais, foi feito um estudo de persistência bacteriana em órgãos de camundongos BALB/c/AnUnib. Os animais foram inoculados com uma única dose oral (via intragástrica) de 10^9 UFCs das linhagens recombinantes χ 3987, χ 4550 e H683 contendo o plasmídio pYA3137trcm2 e controle χ 3987, χ 4550 e H683 contendo o plasmídio pYA3137trc.

Os resultados obtidos com as linhagens χ 3987 e χ 4550 recombinantes não foram satisfatórios, uma vez que não foi possível recuperar bactérias dos órgãos dos camundongos, indicando que estas linhagens, por algum motivo desconhecido, apresentaram deficiência em colonizar e proliferar nos órgãos de camundongos BALB/c/AnUnib. Esta incapacidade não esteve associada à expressão de M2 uma vez que as linhagens controle contendo o plasmídio pYA3137trc também foram incapazes de proliferar nos órgãos e tecidos dos camundongos (dados não mostrados). Este teste foi repetido no mínimo duas vezes com cada uma destas linhagens, mas os resultados foram invariavelmente iguais. Com base nisso, iniciamos os experimentos utilizando a linhagem *S. enterica* Typhimurium H683, cuja mutação que atenua a virulência (Δ aroA Δ aroD) é diferente da mutação introduzida nas linhagens χ 3987 e χ 4550 (Δ cya Δ crp). Os resultados obtidos com a linhagem H683 foram diferentes, tendo sido possível isolar bactérias dos órgãos dos animais (Figura 12). Essa linhagem foi então escolhida para prosseguir nos experimentos de imunização.

A



B

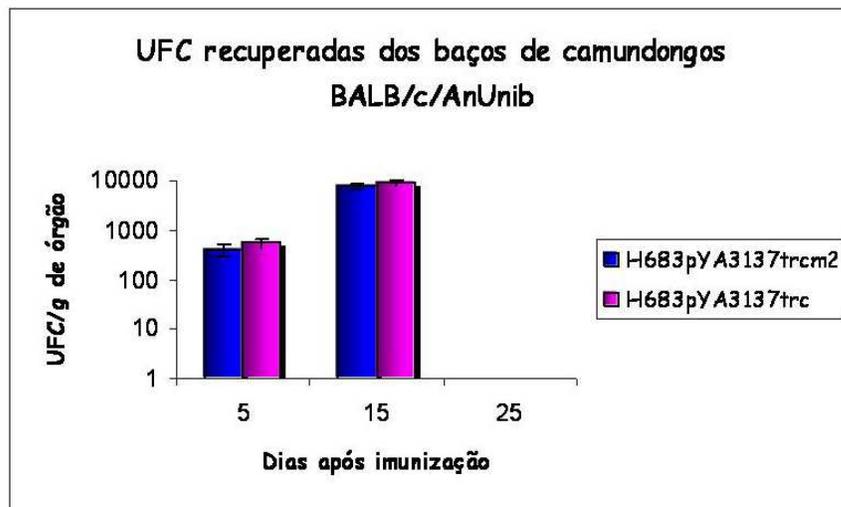


Figura 12: Gráficos demonstrando os resultados da persistência *in vivo* da linhagem *S. enterica* Typhimurium H683 nas placas de Peyer (A) e baço (B) de camundongos BALB/c/AnUnib inoculados com uma única dose (10^9) das linhagens H683pYA3137trc e H683pYA3137trcm2. Os resultados estão expressos como média aritmética de 3 camundongos por amostragem. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de colônias recuperado de linhagens controle e recombinante ($p \leq 0,05$).

4.6. Imunização de camundongos BALB/c/AnUnib.

4.6.1. Análise do título de anticorpos IgG sérico e IgA de mucosa.

Para demonstrar a efetividade da linhagem vacinal em induzir o sistema imune humoral sistêmico e de mucosas contra antígenos de *S. enterica* e contra o antígeno heterólogo carregado, foi feita a análise dos títulos de anticorpos IgG e IgA específicos para o vetor vacinal *S. enterica* Typhimurium e contra a proteína heteróloga M2. Camundongos BALB/c/AnUnib fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, foram imunizadas oralmente com duas doses de 10^9 UFC da linhagem H683, vacinal recombinante pYA3137trcm2 e controle pYA3137trc. Antes da imunização, soro e material fecal foram coletados para servir como controle pré-imunização. As imunizações foram feitas nos dias 0 (início do experimento) e 14. A partir do 15º dia após a segunda imunização, o soro e material fecal foram coletados semanalmente e testados por ELISA.

As médias dos títulos de IgG sérica e IgA de mucosa anti *Salmonella* estão apresentadas na Figura 13. Esses valores estão apresentados como a média aritmética de 8 a 9 camundongos por amostragem. Os títulos de IgG sérica e IgA de mucosa anti *Salmonella* obtidos demonstraram a imunogenicidade da linhagem vacinal. Os títulos foram observados até 35 dias após a segunda imunização. Nos quatro pontos analisados, os títulos para IgG se mantiveram parecidos. Para IgA, o maior título foi obtido 21 dias após a segunda imunização. Em ambos os casos, o maior título obtido foi para a linhagem controle H683pYA3137trc, com exceção de IgG obtida 14 dias após a segunda imunização, sendo a diferença estatisticamente significativa apenas para os títulos de IgA. O título de IgG anti *Salmonella* foi sempre maior que o título de IgA anti *Salmonella*. De fato, os títulos de IgA obtidos para a proteína heteróloga M2 foram muito baixos.

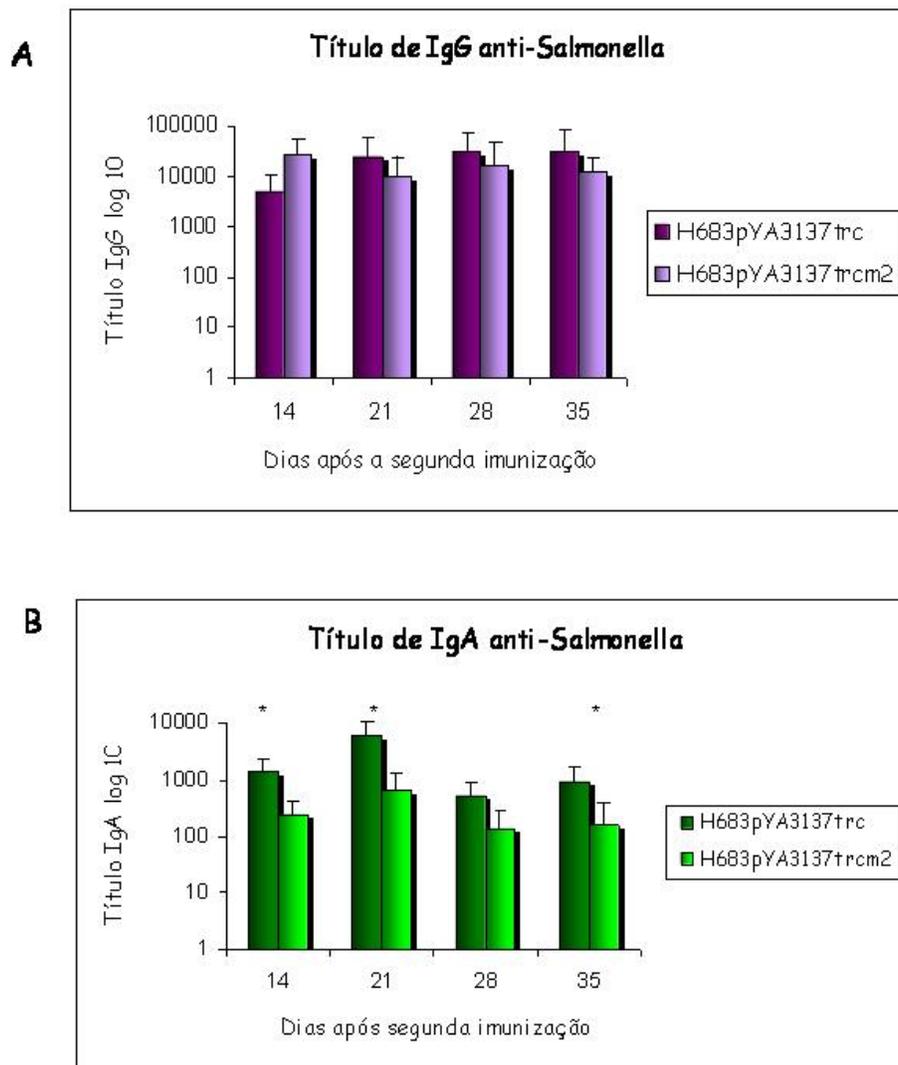


Figura 13: Títulos de anticorpos IgG (A) e IgA (B) anti-*Salmonella* obtidos após a imunização de camundongos BALB/c/AnUnib com as linhagens vacinais controle (H683pYA3137trc) e recombinante (H683pYA3137trcm2). O desvio padrão foi calculado para cada grupo e valores significativos foram comparados pelo teste ANOVA. Os asteriscos representam a diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Dados representam a média do título obtido para 8 a 9 animais por ponto de amostragem.

Os títulos de IgG anti M2 estão apresentados na Figura 14. Os valores estão demonstrados como a média aritmética de 9 camundongos por ponto de amostragem. Os resultados obtidos demonstraram a eficácia da linhagem vacinal em induzir resposta imune também contra o antígeno heterólogo carregado. O título de IgG anti M2 foi observado até 35 dias após a segunda imunização, sendo que o maior título foi observado entre 21 e 28 dias. Os títulos de IgG anti M2 obtidos para a linhagem controle H683pYA3137trc foram semelhantes ao pré-imune e ao background e por isso não são visualizados no gráfico da Figura 14. Os títulos de IgA de mucosa anti-M2, embora detectáveis nas condições experimentais utilizadas neste estudo, foram muito baixos (dados não mostrados).

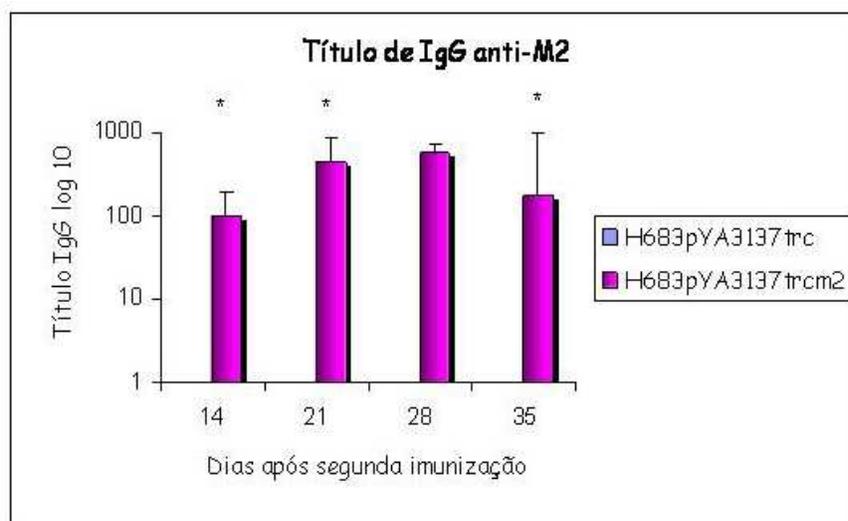


Figura 14: Títulos de IgG anti M2 obtidos após a imunização de camundongos BALB/c/AnUnib com a linhagem vacinal H683pYA3137trcm2. O desvio padrão foi calculado e valores significativos foram comparados pelo teste ANOVA. Os asteriscos representam a diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Dados representam a média do título para 9 animais por ponto de amostragem.

4.7. Desafio e análise da evolução da parasitemia.

O experimento de desafio foi realizado com o intuito de verificar se a formulação vacinal seria capaz de proteger os animais imunizados contra a infecção por *Plasmodium yoelii*. Três grupos formados por sete camundongos BALB/c/AnUnib fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, foram imunizados oralmente com duas doses de 10^9 UFC da linhagem H683, nos dias 0 e 14. Um grupo recebeu H683pYA3137trcm2 (grupo vacinal), o outro recebeu H683pYA3137trc (grupo controle) e o outro grupo recebeu apenas PBS (grupo PBS). Todos os animais foram desafiados no 21º dia de experimento, com 10^5 eritrócitos infectados com *Plasmodium yoelii* e a taxa de sobrevivência e redução na parasitemia foram analisadas a partir do 4º dia após o desafio. Conforme demonstrado na Figura 15, a formulação vacinal não foi capaz de retardar a mortalidade dos animais desafiados, uma vez que todos os animais (grupos controle e vacinal) morreram entre os dias 6 e 9 após o desafio.

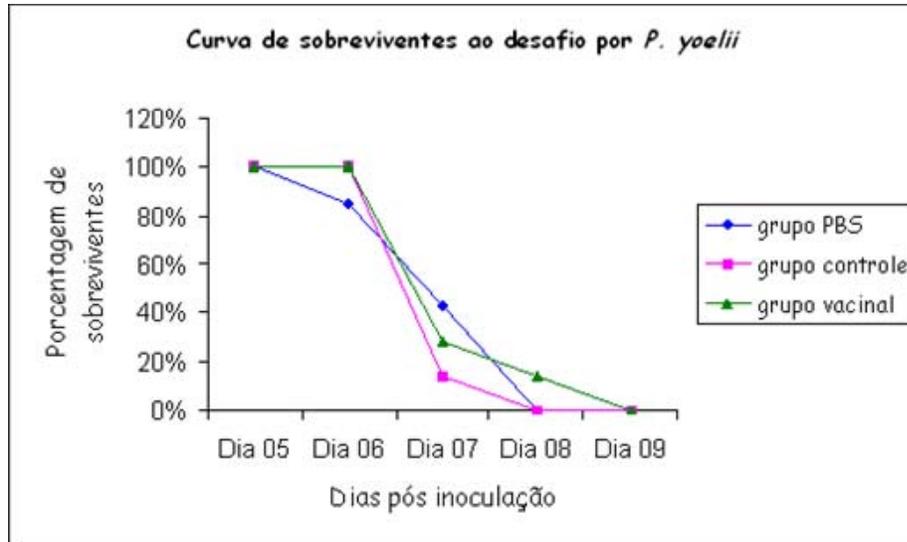


Figura 15: Gráfico demonstrando a porcentagem de animais sobreviventes ao desafio por *P. yoelii*. Cada grupo de animais foi imunizado via intragástrica com duas doses de 10^9 UFC da linhagem vacinal ou controle, ou ainda PBS e desafiados com 10^5 eritrócitos infectados com *Plasmodium yoelii*. Não houve retardo na sobrevivência dos animais, demonstrando que a formulação vacinal não induziu proteção.

Os resultados de parasitemia obtidos nesse experimento estão apresentados na Figura 16, demonstrando que a formulação vacinal também não foi eficaz em reduzir em níveis significativos a porcentagem de parasitemia encontrada nos animais desafiados. Os valores estão demonstrados como a média aritmética da porcentagem de parasitemia obtida nos animais sobreviventes em cada ponto de amostragem.

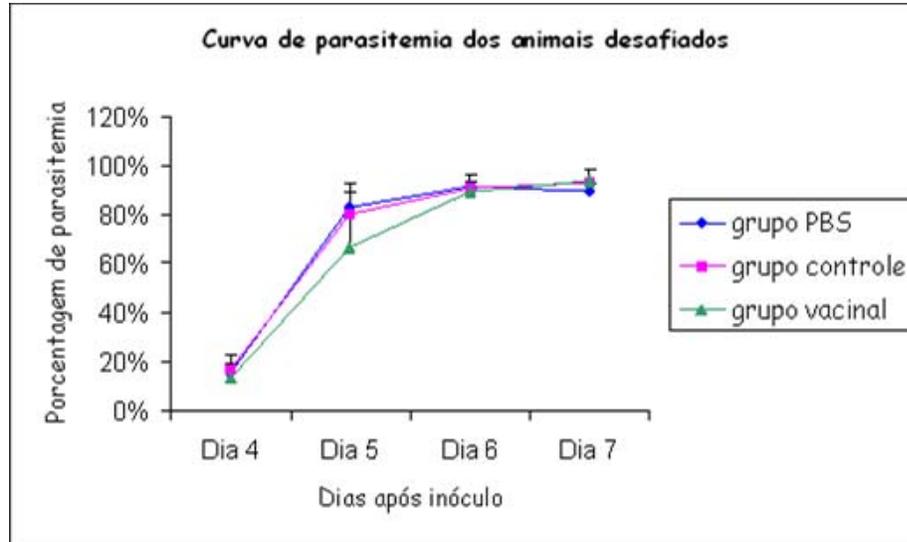


Figura 16: Curva de parasitemia dos animais imunizados e desafiados por *P. yoelii* (7 animais por grupo), demonstrando não haver redução significativa nos níveis de parasitemia ($p \leq 0,05$). Dados representam a média obtida para os animais sobreviventes em cada ponto de amostragem. O desvio padrão foi calculado e as diferenças foram analisadas quanto à significância pelo teste ANOVA.

5. DISCUSSÃO.

A malária é a causa de um milhão de mortes por ano em todo o mundo. As populações mais afetadas pela doença são crianças menores de cinco anos, primigrávidas que vivem em áreas endêmicas e indivíduos que viajam a áreas endêmicas (Pierce & Miller, 2009).

Apesar de alguns mecanismos de controle da doença, como uso de inseticidas para eliminar o inseto vetor e o uso de drogas tradicionais ou mesmo regimes terapêuticos mais recentes serem eficientes (Winstanley *et al.*, 1997), a disseminação da malária aumenta continuamente conforme o aumento da resistência do parasita ao tratamento e do *Anopheles* a inseticidas. Sendo assim, uma vacina contra a malária que fosse eficaz, segura e disponível a populações humanas, independente do nível sócio-econômico, teria um papel fundamental em impedir as mortes causadas pela doença. A vacinação poderia ser utilizada em conjunto com outras intervenções, ajudando a reduzir e, eventualmente, eliminar essa doença (Collins & Barnwell, 2008). A busca por uma vacina efetiva contra a malária vem ocorrendo há aproximadamente 70 anos, porém com pouco sucesso. Apesar do progresso recente, o desenvolvimento de uma vacina para malária ainda é limitado pela complexidade do ciclo de vida do *Plasmodium* spp, por sua capacidade de induzir uma resposta imune específica a cada forma e por desenvolver diversas estratégias de defesa contra a resposta imune do hospedeiro (Good *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, diversos estudos foram realizados com o intuito de identificar e descrever alguns antígenos que possam ser utilizados como alvo potencial para o desenvolvimento de uma vacina contra malária (Collins & Barnwell, 2008). Neste contexto, o antígeno MAEBL, identificado como uma proteína de membrana de 200KDa, expressa no

parasita nos estágios de esporozoítio e merozoítio, se destaca como uma molécula promissora para compor uma vacina de subunidade (Ghai *et al.*, 2002).

Um fator importante na construção de uma vacina de subunidade é o modo como este antígeno será apresentado para o sistema imune, de modo que estimule uma resposta protetora. Neste sentido, o uso de linhagens atenuadas de *Salmonella enterica* tem se mostrado uma proposta atrativa (Qian *et al.*, 2002). Na tentativa de desenvolver uma vacina que conferisse proteção contra a malária no modelo experimental murino, neste estudo foi construída uma linhagem de *S. enterica* Typhimurium expressando o domínio M2 do antígeno MAEBL de *Plasmodium yoelii*.

A possibilidade da clonagem da sequência gênica correspondente ao domínio *m2* do gene *maebl* para sua possível expressão em linhagens atenuadas de *S. enterica* fundamentou-se nos resultados obtidos pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa (IB – UNICAMP), que observou resposta imune celular citotóxica contra um epítipo presente em M2 em animais imunizados com um peptídeo homólogo (dados não publicados). Sabendo da capacidade de linhagens atenuadas de *S. enterica* Typhimurium em induzir resposta imune humoral e celular, contra um antígeno heterólogo carregado, a hipótese testada foi a de que a expressão do domínio M2 da proteína MAEBL por linhagens vacinais atenuadas de *S. enterica* Typhimurium estimularia uma forte resposta imunológica, conferindo altos títulos de anticorpos anti M2, assim como resposta imune celular específica, o que poderia levar a uma proteção no modelo murino da malária causada por *P. yoelii*.

A utilização de *S. enterica* Typhimurium como carreadora do domínio protéico M2 fundamentou-se em diversos trabalhos da literatura demonstrando que muitas linhagens dessa espécie tem sido utilizadas como carreadoras de antígenos vacinais para células do sistema imune (Darji *et al.*, 2000), estimulando assim vários mecanismos efetores,

principalmente os relacionados com a imunidade celular (Babu *et al.*, 2004) e do tipo Th1 (Lange *et al.*, 2004), importantes mecanismos envolvidos na proteção contra patógenos intracelulares. A capacidade de invadir, sobreviver e proliferar no interior de macrófagos, polimorfonucleares e células dendríticas, aliada à disponibilidade de mutantes atenuados faz de *S. enterica* um excelente carreador de antígenos a células do sistema imune. Assim, linhagens atenuadas de *S. enterica* podem ser manipuladas geneticamente de tal forma a expressar antígenos heterólogos, construindo-se linhagens vacinais multifatoriais. Diferentes antígenos derivados de outras bactérias, vírus, fungos, parasitas e mesmo de células de mamíferos foram expressos em linhagens vacinais de *S. enterica*. Estas linhagens foram capazes de induzir resposta imune protetora não somente contra a salmonelose, mas também contra o organismo doador do antígeno heterólogo (Cheminay e Hensel, 2007; Kwon *et al.*, 2007; Loessner *et al.*, 2007; Mahoney *et al.*, 2007). O uso de linhagens vivas atenuadas de *S. enterica* em formulações vacinais apresenta inúmeras vantagens sobre vacinas convencionais (Atkins *et al.*, 2006), dentre as quais: dispensa a purificação do antígeno, permite a passagem do antígeno através da barreira estomacal sem degradação ou desnaturação, não induzindo tolerância imune, dispensa o uso de adjuvantes por se beneficiar de proteínas intrínsecas à bactéria (Karem *et al.*, 1995), estimula resposta imune de mucosa e sistêmica, humoral e celular, tem tropismo por células do sistema imune como células dendríticas e macrófagos, onde é capaz de sobreviver por longos períodos atuando como fonte constante de antígenos, que estimula de maneira persistente o sistema imunológico hospedeiro, entregando o antígeno diretamente nos sítios indutivos da resposta imune. Outro atrativo para seu uso é o fato de que uma vacina baseada em *S. enterica* pode ser administrada por via oral, a rota natural de infecção deste microrganismo (Atkins *et al.*, 2006), oferecendo muitas vantagens sobre vacinas injetáveis, como por exemplo, a

simplicidade de administração, dispensando a esterilização do local e de materiais para sua aplicação, reduzindo assim os riscos de infecção (Nalin, 2002). A eficácia de vacinas vivas baseadas em *S. enterica* Typhimurium recombinante na indução da resposta imune contra o antígeno heterólogo é determinada por múltiplos fatores, incluindo o genótipo do hospedeiro (Fayolle *et al.*, 1994), o genótipo bacteriano (Covone *et al.*, 1998), o tipo de mutação atenuadora da virulência e o sistema de expressão utilizado (Bjorkman *et al.*, 1994). Este deve, preferencialmente, expressar o antígeno heterólogo de forma estável e em grandes quantidades (Medina *et al.*, 2000).

Sendo assim, para a construção do sistema vacinal expressando M2, foram selecionadas as linhagens *S. enterica* Typhimurium χ 3987, um mutante $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$, *S. enterica* Typhimurium χ 4550, atenuada por deleção dos genes *cya* e *crp*, como χ 3987, porém derivada de outra linhagem selvagem (enquanto χ 3987 é derivada da linhagem *S. enterica* Typhimurium UK-1, χ 4550 é derivada da linhagem *S. enterica* Typhimurium SR-11) e também *S. enterica* Typhimurium H683, um mutante $\Delta aroA \Delta aroD \Delta asd$. Todas essas linhagens já foram descritas e utilizadas para a expressão de antígenos heterólogos em procedimentos de imunização, sendo adequadas para esta finalidade por não apresentarem resistência a antibióticos, terem a virulência atenuada e a capacidade de invadir e colonizar os tecidos hospedeiros, sem causar doença (Covone *et al.*, 1998, Schodel *et al.*, 1994, Wu *et al.*, 1995).

O plasmídeo selecionado para a clonagem e expressão de *m2* foi o pYA3137*trc*. A escolha se baseou no fato deste plasmídeo ser um vetor de alto número de cópias e pertencente ao sistema letal balanceado *asd* (Galán *et al.*, 1990). Esse sistema favorece uma

alta e estável expressão de proteínas heterólogas em *S. enterica* e, conseqüentemente, pode levar a uma resposta imune consistente.

Para ser subclonado e expresso nesse sistema, *m2* foi amplificado por PCR. A amplificação do fragmento *m2* de *maebl* utilizando os iniciadores desenhados gerou um amplicon de 1,2 kb, que foi subclonado no plasmídio pGEM-T. A subclonagem em pGEM-T garantiu a digestão enzimática nos sítios de restrição inseridos nas extremidades do fragmento *m2* e possibilitou a formação dos sítios complementares para a correta ligação ao plasmídio pYA3137*trc*. O fragmento *m2* clonado em pGEM-T foi sequenciado para demonstrar a ausência de mutações que poderiam interferir na sequência e conformação da proteína e, conseqüentemente, na resposta imune. Não foram encontradas mutações na sequência *m2*, incluindo a sequência codificadora do epítipo de célula T CD8⁺.

A transferência de *m2* liberado de pGEM-T para pYA3137*trc* ocorreu após a restrição enzimática do vetor de expressão, para a liberação do gene heterólogo *napA* que estava presente em seu sítio de múltipla clonagem. A liberação do sítio de clonagem de pYA3137*trc* gerou a banda de 4,0 kb referente ao plasmídio linearizado. Essa banda foi purificada e utilizada para a ligação com *m2*. O plasmídio construído foi transferido inicialmente para a linhagem de *E. coli* χ 6212, também pertencente ao sistema letal balanceado. Esse passo foi necessário devido à maior facilidade de transformação de *E. coli*, que pode ser transformada pela metodologia de choque térmico, uma vez que a eficiência de transformação de *S. enterica* por este método é extremamente baixa.

Os plasmídios pYA3137*trc* e pYA3137*trcm2* foram transferidos primeiramente para a linhagem *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pelo método de eletroporação. Porém, o processo utilizado para construir as linhagens vacinais foi transdução generalizada mediada por bacteriófago P22HT. Essa metodologia se apresentou como uma alternativa ao processo de

eletroporação que pode resultar na seleção de clones contendo LPS incompletos (Sanches, 2002). Esses clones de *S. enterica* Typhimurium são impróprios para a infecção e avaliação da imunogenicidade, pois apresentam suscetibilidade aumentada ao sistema imune e são, portanto, incapazes de estabelecer uma infecção produtiva em camundongos (Sanches, 2002). O bacteriófago P22HT possui alta afinidade pelo LPS de *S. enterica*, onde se liga para iniciar a infecção da célula bacteriana. A presença dessa macromolécula íntegra é necessária para que a infecção ocorra e a utilização desta metodologia de transferência plasmidial possibilitou selecionar clones recombinantes de *S. enterica* Typhimurium com LPS íntegro para serem utilizados nas imunizações. A linhagem recombinante χ 3987 transformada por eletroporação serviu como doadora de plasmídios para as linhagens *S. enterica* Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683.

As linhagens recombinantes de *S. enterica* Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683 contendo o plasmídio pYA3137P. yoelii a partir do promotor constitutivo *trc*, pois apresentaram por SDS-PAGE uma banda com massa molecular condizente com a esperada para M2, que no *immunoblott* foi reconhecida por anticorpos específicos para a proteína nativa, conforme demonstrado na Figura 10. Essas mesmas linhagens bacterianas foram utilizadas em outros estudos, demonstrando que o promotor *trc* foi eficaz em induzir alta expressão da proteína Nap de *Helicobacter pilory* (Sanches, 2002), VapA de *Rhodococcus equi* (Oliveira *et al.*, 2007), EltAB de *Escherichia coli* Enterotoxigênica (Brocchi *et al.*, 1999; Covone *et al.*, 1998) e a proteína do core Pre-S do vírus da hepatite B (Schödel *et al.*, 1994). Entretanto, a visualização de M2 esbarrou no fato de que a proteína expressa na membrana do parasita tem caráter altamente hidrofóbico e insolúvel em solução aquosa. Foi necessária então, a

adaptação do protocolo de extração de proteínas totais através do uso de um tampão com alta concentração de uréia para a solubilização da proteína.

Algumas proteínas heterólogas podem ser tóxicas às células bacterianas quando expressas em grandes quantidades, dificultando o crescimento da bactéria *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, o crescimento de *S. enterica* Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683 expressando M2 foi comparado com as respectivas linhagens controle (pYA3137trc). Conforme observado na Figura 11, não houve diferenças significativas de crescimento entre as linhagens produtoras de M2 quando comparadas com as linhagens não produtoras *in vitro*. Estes resultados indicam que a expressão de M2 não é tóxica a níveis observáveis para *S. enterica*.

Após o desenvolvimento das linhagens recombinantes de *S. enterica* Typhimurium χ 3987, χ 4550 e H683 expressando altas concentrações de M2, realizou-se a avaliação da capacidade imunogênica dessas vacinas vivas no organismo hospedeiro. A capacidade de organismos vivos, usados em procedimentos vacinais, de invadir e persistir nos tecidos do hospedeiro, bem como a estabilidade do plasmídeo *in vivo*, são elementos essenciais para que os vetores induzam potente resposta imunitária contra o antígeno heterólogo. Alguns relatos mostram que as linhagens atenuadas podem perder sua capacidade de colonização ou podem colonizar os tecidos dos animais em níveis muito baixos ou por curto período de tempo (Garmony *et al.*, 2002; Capozzo *et al.*, 2004). Para verificar a capacidade das linhagens de *S. enterica* Typhimurium contendo os plasmídios pYA3137trc e pYA3137trcm2 de infectar camundongos, foram realizados ensaios de persistência *in vivo*. No caso das linhagens χ 3987 e χ 4550, a inoculação intragástrica não resultou em invasão, persistência ou proliferação no baço e placas de Peyer. A quantidade de UFC recuperada dos

órgãos dos camundongos revelou que essas linhagens atenuadas foram deficientes em proliferar nessas condições. Entretanto, esses resultados não se devem à expressão de *m2*, visto que o mesmo problema ocorreu com os respectivos controles. Novos clones destas linhagens foram obtidos, mas quando utilizados para infectar camundongos, os resultados se repetiram.

Não foi possível determinar as causas que levaram a não colonização dos tecidos hospedeiros por estas linhagens. Vários grupos, incluindo o nosso, vêm utilizando tais linhagens atenuadas de *S. enterica* há vários anos (Covone *et al.*, 1998, Brocchi *et al.*, 1999, Oliveira *et al.*, 2007). Entretanto, resultados similares já tinham sido observados em nosso grupo, o que foi contornado, na ocasião, pela seleção de novos clones bacterianos (Sanches, 2002). Neste estudo, no entanto, quando novos clones foram testados, também não demonstraram capacidade de crescimento *in vivo*.

A avaliação da persistência das linhagens *S. enterica* Typhimurium H683, vacinal e controle revelou que houve invasão e persistência nos tecidos hospedeiros (Figura 12), sugerindo que esta linhagem poderia ser utilizada como fonte de antígeno M2, permitindo o desenvolvimento de resposta imune local e sistêmica. A persistência *in vivo* indicou que células bacterianas são recuperadas em grandes quantidades até 15 dias após a infecção, sendo que após 25 dias de infecção não foi possível reisolar bactérias dos órgãos dos animais. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a UFC recuperada da linhagem recombinante em relação à linhagem controle, demonstrando que a expressão de M2 por não afeta seu crescimento *in vivo*.

Frente aos resultados obtidos na persistência *in vivo*, as linhagens derivadas de H683 (recombinante e controle) foram utilizadas para imunizar camundongos BALB/c/AnUnib. A

imunização foi feita por duas doses de 10^9 UFC em dois grupos de oito camundongos cada. Um grupo foi imunizado com a linhagem recombinante vacinal H683pYA3137trcm2, outro com a linhagem controle H683pYA3137trc e outro grupo recebeu apenas PBS. Posteriormente à imunização, procedeu-se à dosagem de anticorpos específicos para M2 e para *Salmonella* pelo método de ELISA. Através desse experimento foi possível observar a presença de anticorpos específicos para *Salmonella*, o que demonstra a imunogenicidade do vetor vacinal quanto aos antígenos bacterianos. Foram obtidos altos títulos de IgG circulante contra *S. enterica* Typhimurium H683 conforme evidenciado na Figura 13 A. Estes títulos foram maiores para H683pYA3137trc do que para H683pYA3137trcm2, com exceção do primeiro intervalo analisado, porém sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Os títulos de IgG anti- *Salmonella* foram detectados com sucesso até 35 dias após a segunda dose de imunização. Já os títulos de IgA obtidos (Figura 13 B) foram menores que os de IgG, e sempre maiores para a linhagem controle H683pYA3137trc do que para a linhagem recombinante H683pYA3137trcm2, com diferenças estatisticamente significativas entre as duas linhagens nos intervalos dos dias 14, 21 e 35 pós segunda dose de imunização. Esses resultados demonstraram a estimulação do sistema imune de mucosas pelo vetor vacinal *S. enterica* Typhimurium H683.

No teste de ELISA para os anticorpos IgG e IgA específicos para a proteína M2 foi possível detectar títulos de anticorpos para IgG, até 35 dias após a segunda dose da imunização, sendo o maior título obtido no intervalo de 21 a 28 dias pós segunda dose (Figura 14). Esses resultados demonstraram que a expressão da proteína heteróloga *in vivo* foi capaz de estimular resposta imune humoral e corrobora com resultados obtidos por outros antígenos expressos *in vivo* pelo mesmo sistema (Covone *et al.*, 1998, Sanches, 2002). Entretanto, para IgA anti-M2, os títulos observados, apesar de detectáveis, foram

muito baixos. Entretanto, apesar de a grande maioria dos microrganismos iniciar a infecção por interagir com as mucosas do hospedeiro e a indução de resposta imune neste sítio ser essencial para o controle e prevenção dessas doenças (Di Tommaso *et al.*, 1996), esse resultado não é preocupante, uma vez que a infecção por *Plasmodium* spp inicia-se pela derme, sendo que esse tipo de resposta imune não é considerado o mais importante no combate á infecção por esse parasita.

A produção de anticorpos específicos é um fator essencial para a imunidade à malária, uma vez que a proteção é observada através da transferência de soro de indivíduos imunes para indivíduos naïve (Eling, 1980, Sabchareon *et al.*, 1991). Para testar a hipótese de que os anticorpos específicos para a proteína M2, em conjunto com uma possível resposta celular estimulada pela imunização com *S. enterica* Typhimurium seria capaz de proteger os animais imunizados ou retardar a sua mortalidade através de uma redução significativa na parasitemia, procedeu-se ao experimento de desafio e análise da proteção. O grupo de animais imunizados com o vetor vacinal H683pYA3137trcm2, assim como os grupos controle H683pYA3137trc e PBS foram desafiados 21 dias após a segunda dose de imunização, intervalo de tempo onde se detectou o maior título para anticorpos séricos anti-M2. O acompanhamento do efeito da imunização sobre a sobrevivência dos animais desafiados com uma dose letal de *P. yoelii* demonstrou que a imunização não conferiu proteção frente ao desafio, visto que não houve sobrevivência nem retardo na mortalidade, o que foi evidenciado na Figura 15. A análise da evolução da parasitemia demonstrou também não haver diferença estatisticamente significativa entre o número de eritrócitos parasitados isolados do grupo vacinal e dos grupos controles, conforme evidenciado na Figura 16.

Os resultados obtidos neste trabalho descrevem pela primeira vez a expressão da proteína M2 por uma linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium. Até o momento,

poucos trabalhos descrevem o uso de linhagens vivas atenuadas de *S. enterica* como veículos carreadores de antígenos protetores de *Plasmodium* spp. Apesar do fato de a imunização com a linhagem atenuada expressando M2 ter induzido anticorpos que reconheceram a proteína nativa, a magnitude dessa resposta foi menor do que a alcançada pela imunização com o sistema de “*prime-boost*” proteína MAEBL recombinante e DNA (Leite *et al.*, dados não publicados), sendo que esse nível de resposta humoral pode ser uma razão para a ausência de proteção no desafio. É possível que a resposta obtida seja insuficiente, ou ainda, esteja direcionada para epítomos conformacionais que sejam irrelevantes na proteção contra *P. yoelii*.

Conforme já citado, o método de atenuação da linhagem vacinal de *S. enterica* e de expressão do antígeno influenciam na forma de apresentação do antígeno para o sistema imune e, conseqüentemente, na efetividade da resposta imune (Karem *et al.*, 1995). Hesse *et al.* (1996) evidenciaram a importância do sítio de expressão heteróloga em uma linhagem de *Salmonella*, demonstrando que, quando esta secretava os antígenos p60 ou listeriolisina era capaz de induzir proteção contra a listeriose, enquanto a expressão citoplasmática não. Sendo assim, é possível que a localização citoplasmática da expressão de M2 seja inadequada para a indução da resposta imune protetora. Uma mudança na estratégia de expressão de M2, de maneira a direcioná-la para o exterior da célula bacteriana poderia refinar a resposta imune estimulada por esse vetor, visto que proteínas heterólogas tendem a ser mais imunogênicas quando secretadas por vetores como *Salmonella* do que quando expressas em seu citosol.

Para direcionar ainda mais a resposta imune para M2, as alternativas à expressão do antígeno heterólogo no vetor vivo podem ainda, serem combinadas com um refinamento na estratégia de vacinação. Segundo Negi *et al.* (2007), o número de doses requeridas para uma

vacinação efetiva é um fator muito importante para determinar a eficiência de uma vacina. Neste sentido, seria interessante aumentar as doses da formulação vacinal obtida. Mais interessante ainda seria incluir um sistema de vacinação do tipo “*prime-boost*” heterólogo, que envolve a administração sequencial do mesmo antígeno em duas formulações vacinais diferentes, utilizando ou não a mesma rota de administração. Essa estratégia de vacinação demonstrou aumentar a imunogenicidade de antígenos heterólogos expressos por vetores bacterianos vivos (Chinchilla *et al.*, 2007). Londono-Arcilla *et al.* (2002) demonstraram que a administração de *S. enterica* Typhi CVD 908 expressando a urease de *H. pylori* por via mucosa seguida da administração via parenteral da proteína conferiu uma proteção parcial aos camundongos desafiados com *H. pylori*. O sucesso da estratégia de “*prime-boost*” heterólogo também tem sido ilustrado em ensaios com vacinas antimaláricas pré-eritocíticas (Epstein *et al.*, 2004, Moorthy *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004). Voluntários que foram imunizados via parenteral com uma vacina de DNA codificadora da proteína CSP de *P. falciparum* seguida de um *boosting*, também via parenteral, com a RTS,S/AS02A produziram IFN- γ , anticorpos específicos e resposta de células TCD8⁺, fato não observado em voluntários imunizados somente com a vacina de DNA ou com a RTS,S/AS02A, demonstrando que esse regime de vacinação pode ser utilizado para induzir uma imunidade mais robusta contra a malária (Epstein *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004).

Corroborando com os fatos apresentados acima, Chinchilla *et al.*, (2007) demonstraram que o regime de “*prime-boost*” heterólogo combinando a administração via mucosa de uma linhagem atenuada de *S. enterica* Typhi que expressava e exportava a proteína CS de *P. falciparum*, seguida da administração via parenteral de uma vacina de DNA codificando para CSP foi capaz de induzir anticorpos séricos e células T específicos. O mesmo não ocorreu na ausência do *priming* com o vetor vivo, sugerindo que esse regime

de vacinação pode ser uma estratégia promissora no desenvolvimento de uma vacina para a malária.

Os dados preliminares obtidos indicam, portanto, que a linhagem de *S. enterica* Typhimurium expressando a proteína M2 de *P. yoelii* construída neste estudo pode ser utilizada em experimentos futuros, com o intuito de otimizar uma resposta imune protetora para a malária, seja através de modificações na construção, pelo uso de um sistema exportador, seja através de sua utilização em diferentes regimes de imunização.

6. CONCLUSÕES.

1. A linhagem atenuada recombinante *S. enterica* Typhimurium H683 foi capaz de expressar o domínio M2 da proteína MAEBL de *Plasmodium yoelii* a partir do promotor constitutivo *trc*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.
2. Tanto a linhagem controle *S. enterica* Typhimurium H683pYA3137*trc* quanto a linhagem recombinante *S. enterica* Typhimurium H683pYA3137*trcm2* foram capazes de invadir, persistir e proliferar nos órgãos dos camundongos BALB/c/AnUnib imunizados.
3. A linhagem recombinante *S. enterica* Typhimurium H683 expressando o domínio M2 da proteína MAEBL de *Plasmodium yoelii* foi capaz de induzir resposta imune humoral contra a proteína heteróloga em camundongos BALB/c/AnUnib imunizados intragastricamente.
4. O domínio M2 da proteína MAEBL quando expresso pela linhagem vacinal *S. enterica* Typhimurium H683, apesar de imunogênico, não induziu imunidade efetiva capaz de retardar a mortalidade e não reduziu a parasitemia de camundongos BALB/c/AnUnib, não conferindo, portanto, proteção frente à infecção por *P. yoelii*.
5. O potencial vacinal da linhagem recombinante construída pode ainda ser avaliado em novos ensaios combinando diferentes estratégias de imunização.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ADAMNS, J.H.; BLAIR, P.L.; KANEKO, O.; PETERSON, D.S. 2001. An expanding *eb1* family of *Plasmodium falciparum* *Trends in Parasitology*. 17: 297 – 299.

AGGARWAL,A.; KUMAR, S.; JAFFE, R.; HONE, D.; GROSS, M.; SADOFF, J. 1990. Oral *Salmonella*: malaria circumsporozoite recombinantes induce especific CD8 cytotoxic T cells. *J.Exp. Med.* 172: 1083-1090.

ALONSO, P.L.; SACARLAL, J.; APONTE, J.J.; LEACH, A.; MACETE, E.; MILMAN, J.; MANDOMANDO, I.; SPIESSENS, B.; GUINOVART, C.; ESPASA, M.; BASSAT, Q.; AIDE, P.; OFORI-ANYINAM, O.; NAVIA, M.M.; CORACHAN, S.; CEUPPENS, M.; DUBOIS, M.C.; DEMOITIÉ, M.A.; DUBOVSKY, F.; MENÉNDEZ, C.; TORNIEPORTH, N.; BALLOU, W.R., THOMPSON, R.; COHEN, J. 2004. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*: 364: 1411-20.

ASCÓN, M.A.; HONE, D.M.; WALTERS, N.; PASCUAL, D.W. 1998. Oral immunization with a *Salmonella typhimurium* vaccine vector expressing recombinant enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbriae elicits elevated antibody titers for protective immunity. *Infect Immun.* 66: 5470-6.

ATKINS, H.S.; MORTON, M.; GRIFFIN, K.F.; STOKES, M.G.M.; NATARO, J.P.; TITBALL, R.W. 2006. Recombinant *Salmonella* vaccines for biodefence. *Vaccine*. 24: 2710 – 2717.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2ª ed. John Wiley & Sons.2003. 600p.

BABU, U.; DALLOUL, R.A.; OKAMURA, M.; LILLEHOJ, H.S.; XIE, H.; RAYBOURNE, R.B.; GAINES, D.; HECKERT, R.A.. 2004. *Salmonella enteritidis* clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Vet Immunol Immunopathol.* 101: 251-7.

BAIRD, J.K.; JONES, T.R.; DANUDIRGO, E.W.; ANNIS, B.A.; BANGS, M.J.; BASRI, H. et al. 1991. Age-dependent acquired immunity against *Plasmodium falciparum* among people with 2 years exposure to hyperendemic malaria. *Am. J. Tropical Med. Hyg.* 45: 65.

BARBOSA, M.F.; RODRIGUES, C.C.; CAMPOSA, M.E.; CHAVES, I.; NUNESA, Y.; JULIANO, N.F.; NOVO, H.R.; BARBOSA, M.F.A. 1995. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. *J. Microbi Meth.* 22, 39-50.

BIEDZKA-SAREK, M.; EL SKURNIK, M. 2006. How to outwit the enemy: dendritic cells face *Salmonella*. *APMIS.* 114:589-600.

BJORKMAN, J.; HUGLES, D.; ANDERSSON, D.I.. 1998. Virulence of antibiotic resistant *Salmonella* Typhimurium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95: 3949-3953.

BLACKMAN, M.J.; BANNISTER, L.H. 2001. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 117: 11-25.

BOJANG, K.A. 2006. RTS,S/AS02A for malaria. *Expert Rev Vaccines.* 5: 611-5.

BOYD, E.F.; WANG, F.S.; WHITTAM, T.S.; SELANDER, R.K. 1996. Molecular genetic relationships of *Salmonellae*. *Appl Environ Microbiol.* 62: 804-808.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.

BRANDÃO, L.G. 2002. *Comparação entre promotores regulados por PhoP/Q por meio da expressão de GFPmut3: Construção de um sistema para a expressão estável de antígenos heterólogos em linhagens atenuadas de Salmonella enterica Typhimurium*. 137 f. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.

BRANGER, C.G.; FETHERSTON, J.D.; PERRY, R.D.; CURTISS, R. 3RD . 2007. Oral vaccination with different antigens from *Yersinia pestis* KIM delivered by live attenuated *Salmonella typhimurium* elicits a protective immune response against plague. *Adv Exp Med Biol*. 603: 387-99.

BROCCHI, M.; COVONE, M.G.; PALLA, E. & GALEOTTI, C.L. 1999. Integration of minitransposon for expression of the *Escherichia coli elt* gene at a preferred site in *Salmonella typhimurium* identifies a novel putative fimbrial locus. *Archives of Microbiology*. 171: 122-126.

CÁRDENAS, L.; CLEMENTS, J.D. 1992. Oral immunization using live attenuated *Salmonella ssp* as carrier do foreign antigens. *Clin Microbiol. Rev.* 5: 328-42.

CAPOZZO, A.V.; CUBEROS, L.; LEVINE, M.M.; PASETTI, M.F.2004. Mucosally delivered *Salmonella* live vector vaccines elicit potent immune responses against a foreign antigen in neonatal mice born to naive and immune mothers *Infect Immun.* 72, 4637-46.

CÁRDENAS, L.; DASGUPTA, U.; CLEMENTS, J.D. 1994. Influence of strain viability and antigen dose on the use of attenuated mutants of *Salmonella* as vaccine carriers. *Vaccine*. 12:833-40.

CARVALHO, L.J.M.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; GOTO, H. 2002. Malaria vaccine: candidate, antigens, mecanismos, constraints and prospects. *Scand. J. Immunol.* 56, 327-343.

CHATFIELD, S.N.; STRUGNELL, R.A.; DOUGAN, G. 1989. Live *Salmonella* as vaccines and carriers of foreign antigenic determinants. *Vaccine*. 7: 495-8.

CHATFIELD, S.; ROBERTS, M.; LI, J.; STARNES, A.; DOUGAN, G. 1994. The use of live attenuated *Salmonella* for oral vaccination. *Dev Biol Stand.* 82: 35-42.

CHEMINAY, C.; HENSEL, M. 2007. Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *Int. J. Med. Microbiol.* 298.

CHINCHILLA, M.; PASETTI, M.F.; MEDINA-MORENO, S.; WANG, J.Y.; GOMEZ-DUARTE, O.G.; STOUT, R.; LEVINE, M.M.; GALEN, J.E..2007. Enhanced immunity to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (PfCSP) by using *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing PfCSP and a PfCSP-encoding DNA vaccine in a heterologous prime-boost strategy. *Infect.Immun.* 75: 3769–3779.

COLLINS,C.R.; WITHERS-MARTINEZ, C.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M.J. 2009. An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. *PLoS Pathog.* 5: 1000273.

COLLINS, W.E.; CONTACOS, P.G. 1972. Immunization of monkeys against *Plasmodium cynomolgi* by X-irradiated sporozoites. *Nature New Biology.* 236: 176.

COLLINS, W.E.; BARNWELL, J.W.. 2008. A Hopeful Beginning for Malaria Vaccines. *N Engl J Med.* 359: 2599-601.

COVONE, M.G.; BROCCHI, M.; PALLA, E.; SILVEIRA, W.D.; RAPPUOLI, R. AND GALEOTTI, C.L. 1998. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 66: 224-231.

CRAIG, A. SCHERF, A. 2000 Transcriptional analysis in *Plasmodium falciparum* .*Trends Microb.* 8: 350-351.

CRIADO, M.T.; SÁNCHEZ, S.; FERREIROS, C.M. 2008. Classic vaccinology and advances in vaccine design. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26:564-72.

CURTISS III, R.; KELLY, S.M. 1987. *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect. Immun.* 55: 3035-43.

CURTISS III, R.; KELLY, S.M.; GULIG, P.A.; NAKAYAMA, K. 1989. Selective delivery of antigens by recombinant bacteria. *Current Topics in Microbiol. Immunol.* 146: 35-54.

CURTISS, R. 3RD.; NAKAYAMA, K.; KELLY, S.M. 1989. Recombinant avirulent *Salmonella* vaccine strains with stable maintenance and high level expression of cloned genes *in vivo*. *Immunol. Invest.* 18: 583-96.

CURTISS, R. 3RD.; KELLY, S.M.; HASSAN, J.O. 1993. Live oral avirulent *Salmonella* vaccines. *Vet. Microbiol.* 37: 397-405.

CURTISS, R. 3RD.; GALAN, J.E.; NAKAYAMA, K.; KELLY, S.M. 1990. Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains *in vivo*. *Res. Microbiol.* 141: 797-805.

DARJI, A.; LAGE, S.; GARBE, A.I.; CHAKRABORTY, T.; WEISS, S. 1999. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27: 341-9.

DI TOMMASO, A.; SALETTI, G.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; DOUGAN, G.; ABRIGNANI, S.; DOUCE, G.; DE MAGISTRIS, M.T. 1991. Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a non toxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. *Infect. Immun.* 64: 1-6.

DUNSTAN, S.J.; SIMMONS, C.P.; STRUGNELL, R.A. 2003. *In vitro* and *in vivo* stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *Immunol. Med. Microbiol.* 186: 240-245.

EDWARDS, M.F.; STOCKER, B.A. 1988. Construction of delta *aroA* his delta pur strains of *Salmonella typhi*. *J Bacteriol.* 170:3991-5.

EGAN, A.F.; BURGHAUS, P.; DRUILHE, P.; HOLDER, A.A.; RILEY, E.M.. 1999. Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro. *Parasite Immunol.* 21: 133.

ELING, W.M.. 1980. *Plasmodium berghei*: premunition, sterile immunity, and loss of immunity in mice. *Exp. Parasitol.* 49: 89-96.

EPSTEIN, J.E.; CHAROENVIT, Y.; KESTER, K E.; WANG, R.; NEWCOMER, R.; FITZPATRICK, S.; RICHIE, T.L.; TORNIEPORTH, N.; HEPPNER, D.G.; OCKENHOUSE, C.; MAJAM, V. HOLLAND, C.; ABOT, E.; GANESHAN, H.; BERZINS, M.; JONES, T.; FREYDBERG, C.N.; NG, J.; NORMAN, J.; CARUCCI, D.J.; COHEN, J.; HOFFMAN. S.L..2004. Safety, tolerability, and antibody responses in humans after sequential immunization with a PfCSP DNA vaccine followed by the recombinant protein vaccine RTS,S/AS02A. *Vaccine* 22:1592–1603.

EVEREST, P.; FRANKEL, G.; LI, J.; LUND, P.; CHATFIELD, S.; DOUGAN, G. 1995. Expression of LacZ from the *htrA*, *nirB* and *groE* promoters in a *Salmonella* vaccine strain:influence of growth in mammalian cells. *Microbiol. Lett.* 37: 111-119.

FAGAN, P.K.; WALKER, M.J.; CHIN, J.; EAMENS, G.J.; DJORDJEVIC, S.P. 2001. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium* *aroA* SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs. *Microb. Pathog.* 30: 101-10.

FAYOLLE, C.; O'CALLAGHAN, D.; MARTINAEU, P.; CHARBIT, A.; CLÉMENT, J.M.; HOFNUNG, M.; LECLERC, C. 1994. Genetic control of antibody response induced against an antigen delivered by recombinant attenuated *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 62: 4310-19.

FENG, Y.; WANG, S.; LUO, F.; RUAN, Y.; KANG, L.; XIANG, X.; CHAO, T.; PENG, G.; ZHU, C.; MU, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, X.; WU, J. 2008. A novel recombinant bacterial vaccine strain expressing dual viral antigens induces multiple immune responses to the Gag and gp120 proteins of HIV-1 in immunized mice. *Antiviral Res.* 80: 272-9.

FIERER, J.; GUINEY, D.G. 2001. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J.Clin. Invest.* 107: 775-80.

FRAILLERY, D.; BAUD, D.; PANG, S.Y.; SCHILLER, J.; BOBST, M.; ZOSSO, N.; PONCI, F.; NARDELLI-HAEFLIGER, D. 2007. *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing human papillomavirus type 16 L1 as a potential live vaccine against cervical cancer and typhoid fever. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 1285-95.

FREITAS, L.F.; CHAVES, G.C.; WANNMACHER, L.; OSORIO-DE-CASTRO, C.G. 2007. Uncomplicated *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* malaria in Brazil: evidence on single and combined drug treatments recommended by official guidelines: *Cad. Saúde Pública.* 23: 2285-94.

GALÁN JE, NAKAYAMA K, CURTISS R 3RD. 1990. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene.* 94: 29-35.

GARCIA, J.E.; PUENTES, A.; PATARROYO, M.E. 2006. Developmental biology of sporozoite-host interactions in *Plasmodium falciparum* malaria: implications for vaccine design. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 686-707.

GARMORY, H.S.; BROWN, K.A.; TITBALL, R.W. 2002. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol.* 26: 339-53.

GENTRY-WEEKS, C.R.; HULTSCH, A.L.; KELLY, S.M.; KEITH, J.M.; CURTISS, R. III. 1992. Cloning and sequencing of a gene encoding a 21-kilodalton outer membrane protein from *Bordetella avium* and expression of the gene in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 174: 7729-7742.

GHAI, M.; DUTTA, S.; HALL, T.; FREILICH, D.; OCKENHOUSE, C.F. 2002. Identification, expression, and functional characterization of MAEBL, a sporozoite and asexual blood stage chimeric erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 123: 35- 45.

GOMEZ-DUARTE, O.G.; PASETTI, M.F.; SANTIAGO, A.; SZTEIN, M.B.; HOFFMAN, S.L.; LEVINE, M.M. 2001. Expression, extracellular secretion, and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 in *Salmonella* vaccine strains. *Infect. Immun.* 69: 1192 – 1198.

GOOD, M.F. 2005. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitol.* 21: 29-34.

GOOD, M.F.; XU, H.; WYKES, M.; ENGWERDA, C.R.. 2005. Development and regulation of cell mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 69-99.

HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166: 557-580.

HEINZMANN, J.; WILKENS, M.; DOHMANN, K.; GERLACH, G.F. 2008. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-specific mpt operon expressed in *M. bovis* BCG as vaccine candidate. *Vet. Microbiol.* 130: 330-7.

HESS, J.; GENTSCHEV, I.; MIKO, D.; WELZEL, M.; LADEL, C.; GOEBEL, W.; KAUFMANN, S. H. E.. 1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:1458-1463.

HINDLE, Z.; CHATFIELD, S.N.; PHILLIMORE, J.; BENTLEY, M.; JOHNSON, J.; COSGROVE, C.A.; GHAEM-MAGHAMI, M.,;SEXTON, A.; KHAN, M.; BRENNAN, F.R.; EVEREST, P.; WU, T.; PICKARD, D.; HOLDEN, D.W.; DOUGAN, G.; GRIFFIN, G.E.; HOUSE, D.; SANTANGELO, J.D.; KHAN, S.A.; SHEA, J.E.; FELDMAN, R.G.; LEWIS, D.J. 2002. Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. *Infect. Immun.* 70: 3457-67.

HOHMANN, E.L.; OLETTA, C.A.; KILLEEN, K.P.; MILLER, S.I. 1996. *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J. Infect. Dis.*173: 1408-1414.

HOISETH, S.K.; STOCKER, B.A. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*. 291: 238-9.

HOLDER, A.A.; GUEVARA PATINO, J.A.; UTHAIPIBULL, C. 1999. Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. *Parasitologia*. 41: 409-414.

HOLDER, A.A.; TAYLOR, H.M.; TRIGLIA, T.; THOMPSON, J.; SAJID, M.; FOWLER, R.; WICKHAM, M.E.; COWMAN, A.F. 2001. *Plasmodium falciparum* homologue of the genes for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins, which is transcribed but not translated. *Infect. Immun.* 69: 3635-3645.

HONE, D.; ATTRIDGE, S.; VAN DEN BOSCH, L.; HACKETT, J. 1988. A chromosomal integration system for stabilisation of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strains. *Microb. Pathog.* 5: 407-418.

HUANG, Y.; HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S.M. 2000. Construction and characterization of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium clone expressing a salivary adhesin of *Streptococcus mutans* under control of the anaerobically inducible nirB promoter. *Infect. Immun.* 68: 1549-56.

HUSSEINY, M.; HENSEL, M. 2005. Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium vaccine carrier strains. *Infec. Immun.* Mar: 1598–1605.

KAPPE, S.H.; CURLEY, G.P.; NOE, A.R.; DALTON, J.P.; ADAMS, J.H. 1997. Erythrocyte binding protein homologues of rodent malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89: 137–148.

KAPPE, S.H.; NOE, A.R.; FRASER, T.S.; BLAIR, P.L.; ADAMS, J.H. 1998. A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 1230-1235.

KAPPE, S.H.; GARDNER, M.J.; BROWN, S.M.; ROSS, J.; MATUSCHEWSKI, K.; RIBEIRO, J.M.; ADAMS, J.H.; QUACKENBUSH, J. 2001. Exploring the transcriptome of the malaria sporozoite stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 9895.

KAREM, K.L.; CHATFIELD,S.; KUKLIN, K.; ROUSE B.T.. 1995. Differential induction of carrier antigen-specific immunity by *Salmonella typhimurium* live-vaccine strains after single mucosal or intravenous immunization of BALB/c mice. *Infec. Immun.* 63: 4557–4563.

KARIU, T.; YUDA, M.; CHINZEI, Y. 2002. MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J. Exp. Med.* 195: 1317-1323.

KAUFMANN, F. 1978. *Das Fundament*. Munksgaard, Copenhagen.

KAUFMANN, S.H.; RAUPACH, B. & FINLAY, B.B. 2001. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. *Microbes Infect.* 3: 1177-1181.

KOTTON, C.N.; LANKOWSKI, A.J.; SCOTT, N.; SISUL, D.; CHEN, L.M.; RASCHKE, K.; BORDERS, G.; BOAZ, M.; SPENTZOU, A.; GALÁN, J.E.; KWON YM, COX MM, CALHOUN LN. 2007. *Salmonella*-based vaccines for infectious diseases. *Expert. Rev. Vaccines.* 6: 147-52.

HOHMANN, E.L. 2006. Safety and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium delivering an HIV-1 Gag antigen via the *Salmonella* Type III secretion system. *Vaccine.* 24: 6216-24.

KUMAR, S.; COLLINS, W.; EGAN, A.; YADAVA, A.; GARRAUD, O.; BLACKMAN, M.J. *et al.* 2000. Immunogenicity and efficacy in aotus monkeys of four recombinant *Plasmodium falciparum* vaccines in multiple adjuvant formulations based on the 19-kilodalton C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect. Immun.* 68: 2215.

LANGE, U.G.; MASTROENI, P.; BLACKWELL, J.M.; STOBBER, C.B.. 2004. DNA-*Salmonella enterica* serovar Typhimurium primer-boosted vaccination biases towards T helper 1 responses and enhances protection against *Leishmania major* infection in mice. *Infect. Immun.* 72: 4924-8.

LEE, J.J.; SINHA, K.A.; HARRISON, J.A.; DE HORMAECHE, R.D.; RIVEAU G.; PIERCE, R.J.; CAPRON, A; WILSON, R.A.; KHAN, C.M. 2000. Tetanus toxin fragment C expressed in live *Salmonella* vaccines enhances antibody responses to its fusion partner *Schistosoma haematobium* glutathione S-transferase. *Infect. Immun.* 68: 2503-2512.

LONDONO-ARCILA, P.; FREEMAN, D.; KLEANTHOUS, H.A.; O'DOWD, M.; LEWIS, S.; TURNER, A.K.; REES, E.L.; TIBBITTS, T.J.; GREENWOOD, J.; MONATH, T.P.; DARSLEY, M.J. 2002. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing urease effectively immunizes mice against *Helicobacter pylori* challenge as part of a heterologous mucosal priming-parenteral boosting vaccination regimen. *Infect. Immun.* 70: 5096–5106.

LOESSNER H, ENDMANN A, LESCHNER S, BAUER H, ZELMER A, ZUR LAGE S, WESTPHAL K, WEISS S. 2007. Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. *Int. J. Med. Microbiol. In press.*

MAHONEY RT, KRATTIGER A, CLEMENS JD, CURTISS R. 2007. The introduction of new vaccines into developing countries. IV: Global Access Strategies. *Vaccine.* 25: 4003-11.

MAJORI, G. 2004. Combined antimalarial therapy using artemisinin. *Parassit.*46: 85-7.

MALOY, S.R. 1996. *Genetics analysis of pathogenic bacteria: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

MARSHALL, D.G.; HAQUE, A.; FOWLER, R.; DEL GUIDICE, G.; DORMAN, C.J.; DOUGLAS, G. & BOWE, F. 2000. Use of the stationary phase inducible promoters, *spv* and *dps*, to drive heterologous antigen expression in *Salmonella* vaccine strains. *Vaccine.* 18: 1298-1306.

MASTROENI P.; MASKELL D. 2006. *Salmonella infections: Clinical, immunological and molecular aspects.* 1° ed, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

MATUSCHEWSKI, K.; MUELLER, A.K. 2007. Vaccines against malaria – an update. *FEBS Journal.* 274: 4680–4687.

MEDINA, E.; PAGLIA, P.; ROHD, M.; COLOMBO, M.P.; GUZMAN, C.A. 2000. Modulation of host immune response stimulated by *Salmonella* vaccine carrier strains by using different promoters to drive the expression of the recombinant antigen. *Eur. J. Immunol.* 30: 768-777.

MEDINA, E. & GUZMAN, C.A. 2001. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine.* 19: 1573-80.

MILLER, L.H.; GOOD, M.F.; MILON, G. 1994. Malaria pathogenesis. *Science:* 264: 1878-83.

MIZUNO, T.; PLOEG, R.; TROTT, D. 2007. A new concept to stimulate mucosal as well as systemic immunity by parenteral vaccination as applied to the development of a live attenuated *Salmonella enterica* serovar Dublin vaccine. *Vet. Res.* 38: 773–794.

MONACK, D.M.; NAVARRE, W.W.; FALKOW, S. 2001. *Salmonella*-induced macrophage death. *Microbes Infect.* 3: 1201-12.

MOORTHY, V.S.; GOOD, M.F.; HILL, A.V.S. 2004. Malaria vaccine developments. *Lancet.* 363: 150-156.

MOORTHY, V.S.; IMOUKHUEDE, E. B.; KEATING, S.; PINDER, M.; WEBSTER, D. SKINNER, M.A.; GILBERT, S.C.; WALRAVEN, G.; HILL A.V.. 2004. Phase 1 evaluation of 3 highly immunogenic prime-boost regimens, including a 12-month reboosting vaccination, for malaria vaccination in Gambian men. *J. Infect. Dis.* 189:2213–2219.

MOTA, M.M.; HAFALLA, J.C.R.; RODRIGUEZ, A.. 2002. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat. Medicine.* 8:1318-1322.

MOTA, M.M.; RODRIGUEZ, A.. 2004. Migration through host cells: the first step of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cel. Microbiol.* 6: 1113-1118.

NALIN, D.R. 2002. Evidence based vaccinology. *Vaccine.* 20:1624-1630.

NAKAYAMA, K.; SHIOTA, S.; NAKAYAMA, H. 1988. Thymineless death in *Escherichia coli* mutants deficient in the RecF recombination pathway. *Can. J. Microbiol.* 34: 905-907.

NEGI, G.D.; SINGHAMAHAPATRA, S.; CHAKRAVORTTY, D. 2007. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain lacking pmrG-HM-D provides excellent protection against salmonellosis in murine typhoid model. *Vaccine.* 25: 5315–5323.

NOE, A.R.; ADAMS, J.H. 1998. *Plasmodium yoelii* YM MAEBL protein is coexpressed and colocalizes with rhoptry proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 96: 27.

NUSSEENZWEIG, R.S.; VANDERBERG, J.; MOST, H.; ORTON, C. 1967. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature.* 216: 160.

OCAMPO, M.; CURTIDOR, H.; VERA, R.; VALBUENA, J.J.; RODRIGUES, L.E.; PUENTES, A.; LOPEZ, R.; GARCIA, J.E.; TOVAR, D.; PACHECO, P.; NAVARRO, M.A.; PATARROYO, M.E. 2004. MAEBL *Plasmodium falciparum* protein peptides bind specifically to erythrocytes and inhibit *in vitro* merozoite invasion. *BBRC.* 315: 319-329.

OLIVEIRA, A.F.; FERRAZ, L.C.; BROCCHI, M.; ROQUE-BARREIRA, M.C.. 2006. Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the VapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus equi*. *Microbes Infect.* 9: 382-90.

PACHECO, L.G.; ZUCCONI, E.; MATI, V.L.; GARCIA, R.M.; MIYOSHI, A.; OLIVEIRA, S.C.; DE MELO, A.L.; AZEVEDO, V. 2005. Oral administration of a live and attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis. *Acta Trop.* 95: 132-42.

PIERCE, S.K.; MILLER, L.H. 2009. World Malaria Day 2009: what malaria knows about the immune system that immunologists still do not. *J. Immunol.* 182:5171-7.

PIZZA, M.; FONTANA, M.R.; GIULIANI, M.M.; DOMENIGHINI, M.; MAGAGNOLI, C.; NUCCI, D.; HOL, W.; MANETTI, R.; GIANNELLI, V.; C.; NUCCI, D.; HOL, W.; MANETTI, R.; RAPPUOLI, R. 1994. A genetically detoxified derivative of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin induces neutralizing antibodies against the A subunit. *J. Exp. Med.* 180: 2147-2153.

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

PREISER, P.; KAVIRATNE, M.; KHAN, S.; BANNISTER, L.; JARRA, W. 2000. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect.* 2: 1461.

PREISER, P.; RÉNIA, L.; SINGH, N.; BALU, B.; JARRA, W.; VOZA, T.; KANEKO, O.; BLAIR, P.; TORII, M.; LANDAU, I.; ADAMS, J.H. 2004. Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Infec. Immun.* 72: 3604-3608.

RAPPUOLI, R. 2001. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine.* 19: 2688-2691.

QIAN, F.; PAN, W.. 2002. Construction of a tetR-integrated *Salmonella enterica* serovar Typhi CVD908 strain that tightly controls expression of the major merozoite surface protein of *Plasmodium falciparum* for applications in human vaccine production. *Infect. Immun.* 70: 2029-38.

REDE NACIONAL DE SEQUENCIAMENTO - BRGENE. Disponível em <<http://www.brgene.incc.br/>>. Acesso em 03/02/2008.

RIECKMANN, K.H.; BEAUDOIN, R.L.; CASSELLS, J.S.; SELL, K.W. 1979. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. *Bull WHO* 57: suppl 1: 261.

ROBERTS, M.; LI, J.; BACON, A.;CHATFIELD,S. 1998. Oral vaccination against tetanus: comparison of the immunogenicities of *Salmonella* strains expressing fragment C from the *nirB* and *htrA* promoters. *Infect. Immun.* 66: 3080-3087.

ROUSSILHON, C.; OEUVRAY, C.; MÜLLER-GRAF, C.; TALL, A.; ROGIER, C.; TRAPE, J.F.; THEISEN, M.; BALDE, A.; PÉRIGNON, J.L.; DRUILHE, P. 2007. Long-term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. *PLoS Med.* 4: e320.

SABCHAERON, A.; BURNOUF, T.; OUATTARA, D.; ATTANATH, P.; BOUHAROUN-TAYOUN, H. 1991. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am. J. Tropical Med. Hyg.* 45: 297.

SAENZ, F.E.; BALU, B.; SMITH, J.; MENDONÇA, S.R.; ADAMS, J.H. 2008. The transmembrane isoform of *Plasmodium falciparum* MAEBL is essential for the invasion of *Anopheles* salivary glands. *Plos One.* 3: e2287.

SADOFF, J.C.; BALLOU, W.R.; BARON, L.S.; MAJARIAN, W.R.; BREY, R.N.; HOCKMEYER, W.T.; YOUNG, J.F.; CRYZ, S.J.; OU, J.; LOWELL, G.H.; CHULAY, J.D.. 1988. Oral *Salmonella typhimurium* vaccine expressing circumsporozoite protein protects against malaria. *Science*. 240: 336-338.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. 1994. *Salmonella infection*. In: *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach*. ASM Press, Washington DC, pp 229-243.

SALYERS, A.A. E.; WHITT, D.D. 2002. *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach*. 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

SANCHES, L.L. 2002. *Construção, caracterização e imunogenicidade de uma linhagem de Salmonella enterica atenuada produtora da proteína Nap de Helicobacter pylori*. 128 f. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.

SCHODEL, F.; KELLY, S.M.; PETERSON, D.L.; MILICH, D.R.; CURTISS, R III. 1994. Hybrid hepatitis b virus core-pre-s proteins synthesized in avirulent *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* for oral vaccination. *Infect. Immun.* 62: 1669-1676.

SCHOEN, C.; STRITZKER, J.; GOEBEL, W.; PILGRIM, S. 2004. Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int. J. Med. Microbiol.* 294: 319-35.

SEAVEY, M.M.; PAN, Z.K.; MACIAG, P.C.; WALLECHA, A.; RIVERA, S.; PATERSON, Y.; SHAHABI, V. 2009. A novel human Her-2/neu chimeric molecule expressed by *Listeria monocytogenes* can elicit potent HLA-A2 restricted CD8-positive T cell responses and impact the growth and spread of Her-2/neu-positive breast tumors. *Clin. Cancer Res.* 15: 924-32.

SHATA, M.T.; STEVCEVA, L.; AGWALE, S.; LEWIS, G.K.; HONE, D.M. 2000. Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Mol. Med. Today* .6: 66-71.

SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY. D.R. 2004. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2959-65.

SILVIE, O.; RUBINSTEIN, E.; FRANETICH, J.F.; PRENANT, M.; BELNOUE, E.; RENIA, L.; HANNOUN, L.; ELING, W.; LEVY, S.; MAZIER, D. 2003. Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat. Med.* 9: 03-96.

SOMNER, E.A.; OGUN, S.A.; SINHA, K.A.; SPENCER VALERO, L.M.; LEE, J.J.; HARRISON, J.A.; HOLDER, A.A.; HORMAECHE. C.E.; KHAN, C.M. 1999. Expression of disulphide-bridge-dependent conformational epitopes and immunogenicity of the carboxy-terminal 19 kDa domain of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-1 in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Microbiol.* 145: 221-229.

SPRENG, S.; VIRET, J.F. 2005. Plasmid maintenance systems suitable for GMO-based bacterial vaccines. *Vaccine.* 23: 2060-5.

STEVE ROZEN, HELEN J. SKALETSKY. 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386

STRUGNELL, R. A.; MASKELL, D.; FAIRWEATHER, N.; PICKARD, D.; COCKAYNE, A.; PENN, C.; DOUGAN, G. 1990. Stable expression of foreign antigens from the chromosome of *Salmonella typhimurium* vaccine strains. *Gene.* 88: 57-63.

TACKET, C.O.; SZTEIN, M.B.; LOSONSKY, G.A.; WASSERMAN, S.S.; NATARO, J.P.; EDELMAN, R.; PICKARD, D.; DOUGAN, G.; CHATFIELD, S.N.; LEVINE, M.M. 1997. Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in htrA and aroC aroD and immune response in humans. *Infect. Immun.* 65: 452-456.

TOEBE, C.S.; CLEMENTES, J.D.; CARDENAS, L.; JENNINGS, J.G.; WISER, M.F. 1997. Evaluation of immunogenicity of an oral *Salmonella* vaccine expressing recombinant *Plasmodium berghei* merozoite surface protein-1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56: 192-199.

WANG, R.; EPSTEIN, J.; CHAROENVIT, Y.; BARACEROS, F.M.; RAHARDJO, N.; GAY, T.; BANANIA, J.G.; CHATTOPADHYAY, R.; DE LA VEGA, P.; RICHIE, T.L.; TORNIEPORTH, N.; DOOLAN, D.L.; KESTER, K.E.; HEPNER, D.G.; NORMAN, J.; CARUCCI, D.J.; COHEN, J.D.; HOFFMAN S.L. 2004. Induction in humans of CD8_ and CD4_T cell and antibody responses by sequential immunization with malaria DNA and recombinant protein. *J. Immunol.* 172: 5561–5569.

WEBSTER, D.; HILL, A.V.S. 2003. Progress with new malaria vaccines. *Bull WHO.* 81: 902-909.

WEISS, W.R.; ISHII, K.J.; HEDSTORM, R.C.; SEDEGHA, M.; ICHINO, M.; BARNHART, K. 1998. A plasmid encoding murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases protection conferred by a malaria DNA vaccine. *J. Immunol.* 161: 2325.

WINSTANLEY, P.; WATKINS, W.; MUHIA, D.; SZWANDT, S.; AMUKOYE, E.; MARSH, K.. 1997. Chlorproguanil/dapsone for uncomplicated malaria in young children: pharmacokinetics and therapeutic range. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91:322-7.

WHO. 2000. Climate change and malaria: temperatures without fevers?. Malaria – A global crisis. Geneva.

WHO. 2006. What is malaria? Disponível em < <http://w3.who.sea.org/en/Section10/Section21/Section334.htm> >. Acesso em: 20/Nov/2007.

WHO. 2008. World Malaria Report. Disponível em < <http://malaria.who.int/wmr2008/malaria2008.pdf> > Acesso em 30/Jan/2009.

WU, S.; PASCUAL, D.W.; VANCOTT, J.L.; MCGHEE, J.R.; MANEVAL, D.R. JR; LEVINE, M.M.; HONE, D.M. 1995. Immune responses to novel *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* vectors that express colonization factor antigen I (CFA/I) of enterotoxigenic *E. coli* in the absence of the CFA/I positive regulator *cfaR*. *Infect. Immun.* 63: 4933-8.

8. ANEXO.

Meios de cultura e antimicrobianos.

Meio Luria Bertani (LB) (Sambrook e Russell, 2001).

Triptona (Difco).....10% (w/v)

NaCl (Merck).....10% (w/v)

Extrato de Levedura (Difco).....5% (w/v)

Água destilada/deionizada q.s.p.....(v)

Este meio de cultura foi esterilizado, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos.

Meio Luria Bertani - Ágar (LA).

Para o preparo do meio LB-ágar foram adicionados de 1,5 a 2% (w/v) de ágar bacteriológico (Difco) em meio LB. Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos.

Meio SOB (Ausubel *et al.* 2003).

Triptona (Difco).....2% (w/v)

Extrato de levedura (Difco).....0,5% (w/v)

NaCl (Merck).....10 mM

KCl (Merck).....2,5 mM

Água destilada/deionizada q.s.p.....(v)

Este meio foi esterilizado, por autoclavagem, conforme descrito anteriormente.

Meio SOC.

| | |
|--------------------------------------|------------|
| Extrato de Levedura (Difco)..... | 0,5% (w/v) |
| Triptona. (Difco)..... | 2,0% (w/v) |
| NaCl (Merck)..... | 10 mM |
| KCl (Merck)..... | 2,5 mM |
| MgCl ₂ (Merck)..... | 10 mM |
| MgSO ₄ (Merck)..... | 10 mM |
| Glicose (Merck)..... | 20 mM |
| Água destilada/deionizada q.s.p..... | (v) |

Este meio foi esterilizado por autoclavagem a 121° C por 20 minutos.

Meio Ágar Mac Conkey.

O meio de cultura utilizado foi o da formulação fornecida pela Oxoid® (Cambridge, UK). Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos.

Meio LBEDO.

| | |
|---------------------------|-------|
| Meio LB..... | 100mL |
| 50x E-SAL..... | 2 mL |
| 1M D-Glicose.(Merck)..... | 1 mL |

O meio LB foi autoclavado e as soluções de E-SAL e glicose estéreis adicionadas posteriormente.

Meio Mínimo ágar (Curtiss & Kelly, 1987).

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Solução de sais de meio mínimo..... | 100mL |
| Solução de MgCl ₂ 1M..... | 0,4mL |
| Solução de glicose 20%..... | 10mL |
| Água deionizada..... | 1000mL |

A 890mL de água deionizada contendo 1,5% de agar (ACUMEDIA) esterilizados, foram adicionadas as soluções de sais de meio mínimo, cloreto de magnésio e glicose, nos volumes indicados. A solução de glicose foi esterilizada por filtração e as demais por autoclavação. Após homogeneização, o meio foi distribuído em placas de Petri.

Solução de sais de meio mínimo.

| | |
|--|--------|
| NH ₄ Cl (Merck)..... | 50g |
| NH ₄ NO ₃ (Merck)..... | 10g |
| Na ₂ SO ₄ (Merck)..... | 20g |
| K ₂ HPO ₄ (Merck)..... | 90g |
| KH ₂ PO ₄ (Merck)..... | 30g |
| Água deionizada..... | 1000mL |

Após dissolução dos sais em 700mL de água, o pH foi ajustado para 6,8-6,9 com NaOH. O volume da solução foi completado para 1000mL, distribuído em alíquotas de 10mL e autoclavados.

Antimicrobianos e DAP.

Os antibióticos ampicilina e ácido nalidíxico, quando requeridos, foram utilizados nas concentrações de 100µg/mL e 15µg/mL, respectivamente, conforme Sambrook e Russell

(2001). Ácido Diaminopimérico (DAP) quando requerido foi utilizado na concentração de 50µg/mL, conforme descrito em Curtiss *et al.* (1989).

Marcador de peso molecular para ácidos nucléicos.

O marcador de peso molecular padrão utilizado foi o GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas®, São Paulo-SP).

Soluções de uso geral.

Essas soluções foram preparadas com água deionizada esterilizada e, quando necessário, foram esterilizadas por autoclavagem ou filtração, conforme descrito em Sambrook e Russel (2001).

Tampão Salina Fosfatada (PBS) 0,01 M .

| | |
|---|--------|
| Cloreto de Sódio(Merck)..... | 8,00g |
| KCl (Merck)..... | 0,20g |
| KH ₂ PO ₄ (Merck)..... | 0,02g |
| NaHPO ₄ .12H ₂ O (Merck)..... | 2,89g |
| Água destilada/deionizada..q.s.p..... | 1000mL |

Esta solução foi esterilizada, por autoclavagem, conforme descrito anteriormente.

Solução Salina 0,85%.

NaCl (Merck).....0,85g

Água deionizada q.s.p.100mL

NaCl foi diluído em 80mL de água deionizada e o volume completado para 100mL. A solução foi autoclavada e estocada a temperatura ambiente.

D-Glicose 1M.

D-Glicose (Merck).....1,80g

Água deionizada q.s.p.10mL

A solução foi filtrada em filtros de 0,22 μ m (Milipore) e estocada a 4° C.

Solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) 10N.

NaOH (Merck).....4g

Água deionizada q.s.p.1000mL

As pastilhas de NaOH foram dissolvidas em 800mL de água e o volume completado para 1000mL. A solução foi estocada a temperatura ambiente.

Solução de Ácido Clorídrico (HCl) 10N.

HCl concentrado (Merck).....862mL

Água deionizada q.s.p. 1000mL

A solução foi estocada a temperatura ambiente.

Solução para estoque de células bacterianas.

Solução de glicerol 5M.

Para 40mL:

Glicerol (Merck).....16mL

Água deionizada.....24mL

Esta solução foi esterilizada por autoclavagem, nas condições descritas anteriormente.

Soluções para biologia molecular (Sambrook e Russel, 2001).

Solução Tampão Tris-HCl 1M .

Trisma-base (GIBCO BRL).....12,11g

Água deionizada.....100mL

Trisma-base foi dissolvido em 80mL de água deionizada. O pH desejado foi ajustado com solução 10N de HCl e o volume completado para 100mL com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a 4° C.

Solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,5M pH 8.8.

EDTA (Merck).....18,61g

Água deionizada.....100mL

O EDTA foi dissolvido em 80mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 8,8 com solução 10N de NaOH e o volume completado para 100mL com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a 4° C.

Solução Tampão TE pH 8.0.

(10mM Tris-HCl e 1mM EDTA).

1M Tris-HCl pH 8.0 1mL

0,5M EDTA pH 8.0..... 0,2mL

Água deionizada..... 100mL

A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a 4° C.

Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (20%).

SDS (BioAgency)..... 20g

Água deionizada q.s.p. 100mL

O SDS foi dissolvido em 50 mL de água deionizada, sob agitação e o volume completado para 100mL. A solução foi estocada à temperatura ambiente.

Solução de Etanol a 70% (100mL).

Etanol PA (Merck)..... 70mL

Água deionizada..... 30mL

A mistura foi homogeneizada e estocada a 4° C.

Solução para extração de plasmídios em pequena escala (mini-prep) (Sambrook e Russel, 2001).

Solução I.

(25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 50mM glicose).

Solução Tris-HCl 1M pH 8.0.....2,5mL

Solução EDTA 0,5M pH 8.0.....2mL

Solução Glicose 1M.....5mL

Água deionizada.....100mL

A solução foi homogeneizada, autoclavada e estocada a 4° C.

Solução II.

(0,2N NaOH, 1% SDS).

Solução de NaOH.....2mL

Solução de SDS 20%.....5mL

Água deionizada.....100mL

Essa solução foi preparada momentos antes do uso.

Solução III.

(3M Potássio, 5M Acetato).

Solução de Acetato de Potássio 5M.....60mL

Ácido Acético Glacial (Merck).....1,5mL

Água deionizada.....28,5mL

A solução foi homogeneizada, autoclavada e estocada a 4° C.

Solução de fenol clorofórmio 1:1.

Para 20mL:

Fenol.....10mL

Clorofórmio.....10mL

Soluções para transformação bacteriana.

Soluções para choque térmico (Hanahan *et al.*, 1995).

Solução de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 0.1M.

MgCl₂.6H₂O (Merck).....10,1g

Água deionizada.....500mL

O magnésio foi misturado a 450mL de água deionizada e o volume completado para 500mL com água deionizada. A solução foi autoclavada e estocada a 4° C.

Solução de Cloreto de Cálcio (CaCl₂) 0.1M.

CaCl₂. 2H₂O (Merck).....7,35g

Água deionizada.....500mL

CaCl₂ foi dissolvido em 450mL de água deionizada e o volume completado para 500mL com água deionizada. A solução foi autoclavada e estocada a 4° C.

Solução de Cloreto de Cálcio (CaCl₂) 0.1M e Glicerol.

| | |
|--|-------|
| CaCl ₂ ·2H ₂ O (Merck) | 1,47g |
| Glicerol (Merck)..... | 15mL |
| Água deionizada..... | 100mL |

CaCl₂ foi dissolvido em 70mL de água deionizada e 15mL de glicerol. O volume foi completado para 100mL com água. A solução foi autoclavada e estocada a 4° C.

Solução para eletroporação (Ausubel, 2003).

Solução de Glicerol a 10%.

| | |
|----------------------------|--------|
| Glicerol (Merck)..... | 100mL |
| Água destilada q.s.p. | 1000mL |

A solução foi homogeneizada, autoclavada e estocada a 4° C.

Soluções para extração de proteínas.

Tampão B (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 8M Uréia).

| | |
|---|--------|
| NaH ₂ PO ₄ (Merck)..... | 13,8g |
| Tris Cl. (GIBCO BRL)..... | 1,2g |
| Uréia (Merck)..... | 480,5g |
| Água deionizada q.s.p..... | 1000mL |

A solução foi homogeneizada e o pH ajustado para 6,3 com HCl.

Tampão de Amostra 5x.

| | |
|------------------------------|--------|
| Tris-HCl..... | 6,25mL |
| SDS (BioAgency)..... | 1g |
| Glicerol (Merck)..... | 3mL |
| Azul de bromofenol..... | 1,2mg |
| β -mercaptoetanol..... | 1mL |
| Água deionizada..... | 10mL |

O SDS foi dissolvido em Tris-HCl e 1mL β -mercaptoetanol. Foi adicionado o glicerol e o volume completado para 10mL com água. A seguir foi adicionado o azul de bromofenol. A solução foi conservada a 4° C.

Soluções para eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

(Sambrook e Russel, 2001).

Solução de Acrilamida e Bis-acrilamida.

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Acrilamida (GE Healthcare)..... | 30g |
| Bis-acrilamida (GE Healthcare)..... | 0,8g |
| Água destilada q.s.p. | 100mL |

A solução foi filtrada em papel de filtro e armazenada a 4° C em recipiente de vidro envolto com papel alumínio.

Solução Tampão Tris-HCL 1.5M pH 8.8 para gel de separação.

Trisma-base (GIBCO BRL).....18,1g

Água deionizada.....100mL

Trisma-base foi dissolvido em 70mL de água deionizada. O pH foi ajustado para 8.8 com solução 4N de HCl e o volume completado para 100mL com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a 4° C.

Solução Tampão Tris-HCl 0.5M pH 6.8 para gel de empilhamento.

Trisma-base (GIBCO BRL).....6,06g

Água deionizada.....100mL

Trisma-base foi dissolvido em 70mL de água deionizada. O pH foi ajustado para 6.8 com solução 4N de HCl e o volume completado para 100mL com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a 4° C.

Solução de Persulfato de Amônio a 10%.

Persulfato de amônio (GE Healthcare).....1g

Água deionizada.....10mL

A solução foi alíquotada e estocada a 4° C

Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (10%).

SDS (BioAgency).....10g

Água deionizada q.s.p.100mL

O SDS foi dissolvido em 50 mL de água deionizada, sob agitação e o volume completado para 100mL. A solução foi estocada à temperatura ambiente.

Solução Tampão de Corrida.

(25mM Trisma, 250mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8.3)

| | |
|------------------------------|--------|
| Trisma-base (GIBCO BRL)..... | 15,1g |
| Glicina (Merck)..... | 93,5g |
| SDS (BioAgency)..... | 5g |
| Água deionizada..... | 5000mL |

Os solutos foram dissolvidos em 2000mL de água deionizada e o volume completado para 5000mL. A solução foi estocada a temperatura ambiente.

Solução de Coloração Coomassie Blue.

(0,2% Coomassie Blue, 50% Metanol, 10% Ácido Acético).

| | |
|------------------------------------|-------|
| Coomassie Blue R250 (Bio-Rad)..... | 0,2g |
| Metanol (Merck)..... | 50mL |
| Ácido acético glacial (Merck)..... | 10mL |
| Água deionizada.q.s.p. | 100mL |

O metanol e ácido acético foram misturados e o volume completado para 100ml com água deionizada. Coomassie blue foi adicionado e dissolvido. A solução foi filtrada em papel de filtro e estocada a temperatura ambiente

Solução de descoloração.

(30% Metanol, 10% Ácido Acético).

| | |
|------------------------------------|--------|
| Metanol (Merck)..... | 300mL |
| Ácido acético glacial (Merck)..... | 100mL |
| Água deionizada.q.s.p. | 1000mL |

A solução foi homogeneizada e estocada a temperatura ambiente.

Soluções para *Immunoblot* (Sambrook e Russel, 2001).

Tampão de Transferência.

(25mM Trisma, 192mM Glicina e 20% Metanol).

| | |
|------------------------------|--------|
| Trisma-base (GIBCO BRL)..... | 3g |
| Glicina (Merck)..... | 14,4g |
| Metanol (Merck)..... | 200mL |
| Água deionizada q.s.p. | 1000mL |

Glicina e Trisma foram dissolvidos em 600mL de água deionizada. O metanol foi adicionado e o volume completado para 1000mL.

Solução bloqueadora e de lavagem.

(PBS, 3% leite desnatado, 0,1% Triton-X-100).

| | |
|-------------------------------|--------|
| Leite desnatado (Molico)..... | 30g |
| Triton X-100 (Sigma)..... | 1mL |
| Solução de PBS 1x..... | 1000mL |

Essa solução foi preparada momentos antes do uso e conservada, se necessário, por algumas horas a 4° C.

Solução Tampão Pré-Coloração.

(50mM Tris-HCl pH 6.8).

Solução Tris-HCl 1M pH 6.810mL

Água deionizada.....190mL

A solução foi estocada a 4° C.

Solução de Coloração.

Solução Tris-HCl 50mM.....20mL

Solução de 4-cloro-1-naftol a 0,3% (Acros Organics).....5mL

Água oxigenada 30% (Merck).....7µL

Os componentes foram adicionados na ordem indicada. A solução foi preparada imediatamente antes do uso.

Soluções para o preparo do bacteriófago P22HT. (Maloy, 1996).

Solução salina E-SAL 50x 10

Para 10mL:

Água deionizada.....6,7mL

MgSO₄.H₂O (Merck).....0,1g

Ácido cítrico. H₂O (Merck).....1g

K₂HPO₄ (Merck).....5g

NaH₂NH₄PO₄ (Merck).....1,75g

Os solutos foram dissolvidos na ordem indicada sob agitação. O volume foi ajustado para 10mL com água deionizada. A solução foi autoclavada e estocada a temperatura ambiente.

BS 10x (Salina Tamponada).

| | |
|--|-------|
| Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (Merck)..... | 110g |
| KH ₂ PO ₄ (Merck)..... | 30g |
| NaCl (Merck)..... | 8,5g |
| Água deionizada q.s.p. | 200mL |

Os solutos foram dissolvidos em 100mL de água deionizada e o volume completado para 200mL. A solução foi autoclavada e conservada a 4° C.

Solução para processamento de material fecal.

| | |
|-----------------------|-------|
| PBS..... | 20mL |
| 1mM PMSF (Sigma)..... | 200µL |
| 1% BSA (USB)..... | 0,2g |

A solução de 1mM PMSF e o BSA foram adicionados ao PBS e homogeneizados em vortex.

Solução de Fluoreto de Fenilmetilssulfonil (PMSF) 0,1M.

| | |
|-------------------|--------|
| PMSF (Sigma)..... | 17,4mg |
| Isopropanol..... | 1mL |

O PMSF foi dissolvido em isopropanol e a solução estocada a temperatura ambiente.

Soluções para ELISA (Pizza *et al.*, 1994).

Tampão carbonato de sódio 0,5M pH 9,6.

Solução A: Carbonato de sódio 0,5M:

Na₂CO₃ (Merck).....5,3g

Água deionizada.....100mL

Solução B: Bicarbonato de sódio 0,5M:

NaHCO₃ (Merck).....4,2g

Água deionizada.....100mL

A solução A foi misturada com a solução B até ser alcançado o pH de 9,6. O tampão foi conservado a 4° C.

Solução Bloqueadora.

(5% leite desnatado, 2,5% BSA e PBS).

Leite desnatado.....50g

BSA.....25g

PBS.....1000mL

Essa solução foi preparada momentos antes do uso.

Tampão Fosfato-citrato.

Ácido Cítrico (Merck).....10,2g

Na₂HPO₄ (Merck).....14,6g

Água deionizada q.s.p.....1000mL

O pH foi ajustado para 5,0 com ácido cítrico 0,2M e o tampão foi acondicionado a 4°C.

Substrato para ELISA (OPD).

OPD.....34mg

Tampão fosfato-citrato.....100mL

Água oxigenada (Merck).....100µL

A solução foi preparada momentos antes do uso.