HALYKA LUZÓRIO FRANZOTTI VASCONCELLOS

DESENVOLVIMENTO DE CEPAS DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* CALMETTE-GUÉRIN (BCG) E *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* QUE EXPRESSAM FATORES DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)

Tese apresentada ao Programa de Pós–Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

HALYKA LUZORIO FRANZOTTI VASCONCELLOS

DESENVOLVIMENTO DE CEPAS DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* CALMETTE-GUÉRIN (BCG) E *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* QUE EXPRESSAM FATORES DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)

Tese apresentada ao Programa de Pós–Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva

Versão original.

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Vasconcellos, Halyka Luzorio Franzotti.
Desenvolvimento de cepas de *Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin (BCG) e *Mycobaterium smegmatis* que expressam fatores de virulência *de Escherichia coli* enteropatogênica / Halyka Luzorio Franzotti Vasconcellos. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Antígenos e adjuvantes vacinais.

Versão do título para o inglês: Generation of recombinant bacillus Calmette–Guérin and *Mycobacterium smegmatis* expressing BfpA and intimin as vaccine vectors against enteropathogenic *Escherichia coli*.

1. BfpA 2. Intimina 3. Clonagem 4. Vacina 5. Diarreia 6. EPEC
I. Silva, Prof. Dr. Wilmar Dias da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB09/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Halyka Luzorio Franzotti Vasconcellos.

Título da Tese: Desenvolvimento de cepas *de Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin (BCG) e *Mycobaterium smegmatis* que expressam fatores de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica.

Orientador(a): Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento de Sistema de Produção de cepas de *Mycobacterium bovis calmetteguérin* (BCG) que expressam fatores de virulência de *E. coli* enteropatogênica (EPEC)" **protocolo nº 737/10**, sob a responsabilidade de Wilmar Dias da Silva e Halyka Luzório Franzotti Vasconcellos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/09/2010.

Vigência do Projeto: 09/2010 – 08/2013	**N° de animais/espécie**
Laboratório de Imunoquímica	200 camundongos Balb/c Fêmeas 200 camundongos C57Bl/6 Fêmeas

São Paulo, 14 de setembro de 2010.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Dedico esta Tese a Deus e minha Família,

Principalmente, minha Filha.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS pelo dom da vida, pelo dom da fé que me fez seguir em frente e não desistir nunca, por me conceder o privilégio de conhecer todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para minha vida chegar até aqui, na realização de um sonho!!!

Minha família, a base de tudo!!!! Meus pais, irmãs, cunhados e sobrinhos!!! Um Obrigada especial ao meu marido, por ter sido tão paciente e me apoiado tanto!!! E agora a minha filha Luiza, que aguentou firme enquanto eu escria esta tese!!!

Ao meu querido Prof. Wilmar Dias da Silva, meu orientador querido, segundo pai!!! Obrigada por sempre tornar meu caminho mais suave!!! Orgulho-me muito de trabalhar com o Senhor!

Aos queridos amigos dos Laboratórios de Imunoquímica e Biotecnologia IV, do Instituto Butantan, que nunca se mostraram cansados para me ajudar, sem vocês eu não teria conseguido. As secretárias Darlene, Elaine e Lia, por me ajudarem sempre com as documentações, aos funcionários dos biotérios, as meninas da faxina, aos técnicos, meu muito obrigada!!! Minhas amigas do coração, Karina, Cybelle, Dúnia que fizeram minha vida longe de casa ser muito agradável, vocês são indispensáveis, vocês me ajudaram muito em todos os experimentos e não me deixaram desanimar!!! Aos amigos Alex, Henrique, Estevam pelos momentos alegres. Ao meu querido amigo Ivan por fazer parte de todo esse projeto!!! Meu muito obrigada a todos vocês!!!!

Aos professores e técnicos do ICB e do Butantan, que não cansaram de me ajudar, com muito carinho, para que meus experimentos obtivessem sucesso.

Obrigada pela compreensão e paciência, em todos os momentos desses 4 anos de amizade, pelo exemplo de ânimo e bom humor, mesmo diante das dificuldades. Nunca vou esquecer da confiança e do incentivo!!! Agradecerei sempre....

Ao Dr. André Kipnis por me co-orientar e sempre se mostrar disposto a me ajudar, mesmo a distância! Muito obrigada sempre!!!

A Dra Luciana Leite e a Dra Roxane Piazza, Chefes de Laboratórios do Instituto Butantan e suas equipes, que abriram as portas dos seus laboratórios e me receberam muito bem, esse estágio foi fundamental para meu trabalho.

Aos doutores que se dispuseram a participar da minha banca.

Aos funcionários da Biblioteca pela revisão textual e suporte de informática destas diretrizes.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!

O verdadeiro homem mede a sua força, quando se defronta com o obstáculo.

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

VASCONCELLOS, H. L. **Desenvolvimento de cepas de *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin (BCG) e *Mycobacterium* smegmatis que expressam fatores de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)** 2013. 113 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) é uma importante causa de diarreia infantil. EPEC adere no epitélio intestinal causando lesão *attaching and effacing* (A/E). Cepas recombinantes de *Mycobacterium smegmatis* (Smeg) e *Mycobacterium bovis* BCG foram construídas para expressar as proteínas de EPEC BfpA ou Intimina. O gene *bfpA* e uma porção do gene *intimina* foram amplificador do DNA genômico de EPEC por PCR e inserido nos sítios de restrição BamHI/KpnI no vetor pMIP12. Os vetores pMH-*bfp*A e pMH-*intimina* foram inseridos, separadamente, nas cepas de Smeg e BCG. Clones recombinates foram selecionados pela resistência a kanamicina. A expressão dos genes foi detectada por *Immunobloting* usando anticorpo policlonal anti-BfpA ou anti-Intimina como anticorpo primário. A imunogenicidade dessas proteínas foi avaliada em camundongos C57BL/6 pela presença de anticorpos IgA e IgG anti- BfpA ou anti-Intimina no soro e nas fezes. TNFα e INFγ foram produzidos *in vitro* por células do baço de camundongos imunizados com as vacinas recombinantes. A adesão de EPEC (E2348/69) em células alvo Hep-2 foi bloqueada pelos anticorpos IgA ou IgG dos camundongos imunizados com as vacinas recombinantes, mas não por anticorpos de camundongos não imunizados. Essas vacinas recombinantes podem ser candidatas promissoras para uma futura vacina anti-EPEC.

Palavras- chave: Diarreia. EPEC. BCG. *M. smegmatis*. Vacina recombinante. *bfp*A. *intimina*.

ABSTRACT

VASCONCELLOS, H. L. **Generation of recombinant bacillus Calmette–Guérin and Mycobacterium smegmatis expressing BfpA and intimin as vaccine vectors against enteropathogenic Escherichia coli.** 2013. 113 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) is an important cause of diarrhea in children. EPEC adheres to the intestinal epithelium and causes attaching and effacing (A/E) lesions. Recombinant Mycobacterium smegmatis (Smeg) and Mycobacterium bovis BCG strains were constructed to express either BfpA or intimin. The entire bfpA gene and a portion of the intimin gene were amplified by PCR from EPEC genomic DNA and inserted into the pMIP12 vector at the BamHI/KpnI sites. The pMH- *bfp*A and pMH- *intimin* vectors were introduced separately into Smeg and BCG. Recombinant clones were selected based on kanamycin resistance and designated rSmeg pMIP (bfpA or intimin) and rBCG pMIP (bfpA or intimin). The expres-sion of bfpA and intimin was detected by Western blotting using polyclonal anti-BfpA and anti-intimin primary antibodies. The immunogenicity of these proteins was assessed in C57BL/6 mice by assaying the feces and serum for the presence of anti-BfpA and anti-intimin IgA and IgG antibodies. TNF- _ and INF- _ were produced in vitro by spleen cells from mice immunized with recombinant BfpA, whereas TNF- _ was produced in mice immunized with recombinant intimin. The adhesion of EPEC (E2348/69) to Hep-2 target cells was blocked by IgA or IgG antibodies from mice immunized with recombinant BfpA or intimin but not by antibodies from non-immunized mice. Immunogenic non-infectious vectors containing relevant EPEC virulence genes may be promising vaccine candidates.

Keywords: Diarrhea. EPEC. BCG. *M. smegmatis*. Recombinant vaccine. *bfp*A. *intimin*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema dos quatro estágios de patogênese de EPEC 29

Figura 2- Purificação da proteína BfpA em coluna de níquel..... 67

Figura 3- Purificação da proteína Intimina em coluna de níquel..... 67

Figura 4- Títulos de anticorpos IgG Total anti-BfpA produzidos por camundongos BALB/C imunizados pela via intramuscular..... 68

Figura 5- Títulos de anticorpos IgG total anti-Intimina produzidos por camundongos BALB/C imunizados pela via intramuscular..... 69

Figura 6- Fragmentos dos genes *bfp*A e *intimina* amplificados por PCR 70

Figura 7- Representação esquemática das clonagens dos genes *bfp*A e *intimina* no vetor de expressão pMIP12 70

Figura 8- Validação da clonagem dos vetores pMH12-*bfp*A e pMH12-*intimina* 71

Figura 9- Expressão da proteína BfpA de EPEC em *Mycobacterium smegmatis* e BCG 73

Figura 10- Expressão da proteína Intimina de EPEC em *Mycobacterium smegmatis* e BCG 73

Figura 11- Detecção anticorpos IgA sérico e secretados anti-BfpA pré-imunização e pós-imunização via oral 74

Figura 12- Detecção anticorpos IgA sérico e secretado anti-Intimina pré-imunização e pós-imunização via oral..... 75

Figura 13- Detecção de anticorpos IgG Total sérico e seus Isótipos IgG1 e IgG2a antígeno-específicos anti-BfpA ou anti-Intimina após 4ª imunização por via intraperitoneal 76

Figura 14- Detecção de anticorpos IgA **sérico e secretados anti-BfpA de camundongos imunizados via oral com as vacinas rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA**..... 77

Figura 15- Detecção de anticorpos IgA **sérico e secretados anti-Intimina de**

camundongos imunizados via oral com as vacinas rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina 78

Figura 16- Detecção das proteínas recombinantes BfpA e Intimina por anticorpos anti-BfpA ou anti-Intimina presentes no soro dos camundongos imunizados com as vacinas rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA ou rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina..... 79

Figura 17- Produção de citocinas após reestímulo *in vitro* de esplenócitos de camundongos imunizados via oral com as vacinas recombinantes que expressam BfpA 80

Figura 18- Produção de citocinas após reestímulo *in vitro* de esplenócitos de camundongos imunizados via oral com as vacinas recombinantes que expressam Intimina. 81

Figura 19- Avaliação do aumento de linfócitos T e B presentes no baço de camundongos imunizados VO e IP com as vacinas recombinantes que expressam BfpA ou Intimina..... 82

Figura 20- Avaliação da capacidade de inibição da adesão de EPEC típica (E2348/69) por anticorpos presentes no soro de camundongos imunizados oralmente com vacinas recombinantes expressando BfpA ou Intimina..... 84

Figura 21- Avaliação da capacidade de inibição da adesão de EPEC típica (E2348/69) por anticorpos presentes nas fezes de camundongos imunizados oralmente com vacinas recombinantes expressando as proteínas BfpA ou Intimina..... 84

Figura 22- Avaliação da capacidade de inibição da adesão de EPEC típica (E2348/69) por anticorpos presentes no soro de camundongos imunizados intraperitonealmente com vacinas recombinantes expressando BfpA ou Intimina..... 85

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1- Prevalência de EPEC em crianças com diarreia em países em desenvolvimento 39

Quadro 1- Patótipos de *E. coli* Diarreiogênicas 22

Quadro 2- Oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR dos genes *bfpA* e *intimina* de *E. coli* 54

Quadro 3- Divisão dos grupos de camundongos para imunização Via Oral 59

Quadro 4- Divisão dos grupos de camundongos para imunização Via Intraperitoneal 60

Quadro 5- Esquema de imunização de camundongos para verificar a produção de anticorpos anti-BfpA ou anti-Intimina 61

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Adesão ou aderência agregativa
AE	*Attachment and Effacement*
AIF	Adjuvante incomplete de Freund
APC	Célula apresentadora de antígeno
APS	Persulfato de Amônio
BfpA	*Bundle – forming pili* A (subunidade principal do BFP)
BFP	*Bundle – forming pili*
BCA	Ácido Biciconínico
BSA	Albumina Sérica Bovina
$CD4^+$	Célula T $CD4^+$
$CD8^+$	Célula T $CD8^+$
CTL	Linfócito T citotóxico
DAB	Diaminobenzidina
DC	Célula dendrítica
DMEM	Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco´s
D.O.	Densidade Óptica
DTT	Ditiotreitol
EAEC	*Escherichia coli* enteroagregativa
EAF	Fator de aderência à EPEC (plasmídeo)
EHEC	*Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC	*Escherichia coli* enteroinvasiva

ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Ligado á Enzima
Esp	Proteínas secretadas por EPEC
ETEC	*Escherichia coli* enterotoxigênica
FAE	Epitélio associado ao folículo
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino
GP2	Glicoproteína 2
IgG	Imunoglobulina G
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
i.p.	Intraperitoneal
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactosídeo
LA	Aderência localizada
LEE	*Lócus of Enterocyte Effacement*
LP	Lâmina própria
MALT	Tecido linfóide associado a mucusa
MCS	Clonagem em múltiplos sítios
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
min.	Minutos
MLC	Proteína quinase cadeia leva da miosina
MLN	Linfonodo mesentérico

OADC	Ácido oleico-albumina-dextrose-catalase
OPD	Ortofenildiamina
PBS	Tampão Salina Fosfato
pIgR	Receptor polimérico de Imunoglobulina
PKC	Proteína C quinase
PMN	Polimorfonucleares
PP	Placa de peyer
RA	Ácido retinóico
rBCG	BCG recombinante
rSmeg	*Mycobacterium smegmatis* recombinante
SEP	Proteína efetora secretada
SFB	Soro fetal bovino
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
T3SS	Sistema de secreção tipo 3
Tir	Receptor de intimina
WAS	*Wiskott- Aldrich Syndrome*
WASP	*Wiskott- Aldrich Syndrome Protein*
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

1.1 *Escherichia coli* enteropatogênica 22

1.2 Estágios da interação entre EPEC e Enterócito 27

1.3 BFP 30

1.4 Intimina 32

1.5 *Mycobacterium smegmatis* 33

1.6 *Mycobacterium* bovis BCG 34

1.7 Administração de vacinas pela via oral 35

1.8 Sílicas mesoporosas altamente ordenadas 36

1.9 Epidemiologia 37

1.10 Imunologia das mucosas 39

1.11 Tecidos linfoides associados a mucosa 42

2 JUSTIFICATIVA 46

3 OBJETIVOS 48

3.1 Objetivo geral 49

3.2 Ojetivos específicos..... 49

4 Materiais e Métodos 50

4.1 Animais 51

4.2 Bactérias e condições de cultura 51

4.3 Purificação de BfpA recombinante 51

4.4 Purificação de Intimina recombinante 54

4.5 Produção de anticorpos anti-BfpA e anti-Intimina 53

4.6. Plasmídeos 54

4.7 PCR e sub-clonagem em pGEMT- Easy 54

4.8 Clonagem dos genes *bfp*A e *intimina* no vetor de expressão em

Mycobatéria pMIP12 55

4.9 Transformação e seleção 55

4.10 Extração de proteínas 56

4.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS PAGE) 56

4.12 *Immunobloting* 57

4.13 Preparação da vacina 58

4.14 Determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) 58

4.15 Sílica SBA-15: Sílicas mesoporosas altamente ordenadas 58

4.16 Esquema de imunização 59

4.17 Imunização via oral (VO) 60

4.18 Imunização via intraperitoneal (IP) 60

4.19 Coleta de sangue 61

4.20 Coleta de fezes 61

4.21 Obtenção de células do baço 61

4.22 Elisa 62

4.23 Detecção de anticorpos anti-BfpA por *Immunobloting* 62

4.24 Detecção de citocinas em sobrenadantes de culturas de células 63

4.25 Análise por citometria de fluxo 63

4.26 Ensaio de inibição de aderência de EPEC em Hep-2 64

4.27 Análises estatísticas 64

5 RESULTADOS 65

5.1 Purificação e expressão das proteínas BfpA e Intimina recombinantes 66

5.2 Avaliação da produção de anticorpos IgG total produzido em camundongos 67

5.3 Clonagem das sequências codificadoras para BfpA e Intimina de EPEC no plasmídeo pMIP12 69

5.4 Validação da clonagem dos vetores pMH12-*bfp*A e pMH12-*intimina* 71

5.5 Expressão das proteínas BfpA e Intimina em *Mycobacterium smegmatis* recombinante (rSmeg) e BCG recombinante (rBCG) 71

5.6 Resposta imune humoral com produção de anticorpos IgA contra as proteínas BfpA e Intimina em animais imunizados por via oral 73

5.7 Resposta imune humoral com produção de anticorpos séricos IgG contra as proteínas BfpA e Intimina em animais imunizados por via intraperitoneal .. 75

5.8 *Immunobloting* das proteínas recombinantes BfpA e Intimina usando os soros dos animais imunizados com as vacinas recombinantes 76

5.9 Avaliação das citocinas produzidas *in vitro* 79

5.10 Avaliação dos linfócitos no baço dos animais imunizados 81

5.11 Ensaio de inibição de adesão de EPEC a células Hep-2 82

6 DISCUSSÃO 86

7 CONCLUSÕES 94

REFERÊNCIAS 96

ANEXO- Artigo publicado 107

1INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli* Enteropatogênica

Escherichia coli, identificada em 1885,é um bacilo Gram negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, aofiloγ-proteobactéria e ao gênero *Escherichia*. Exerce um papel importante na manutenção da fisiologia intestinal humana e animal (NATARO et al., 1998), sendo o principal microorganismo facultativo da microbiota do intestino grosso humano (cerca de 10^{12} bactérias) (SILVA et al., 2005). *E. coli* coloniza o trato gastrointestinal dentro de poucas horas após o nascimento do hospedeiro e as infecções são causadas quando ocorre um desequilíbrio entre as cepas comensais e as patogênicas.

Ao longo do tempo, cepas de *E. coli* patogênicas adquiriram genes codificadores de fatores de virulência específicos, obtidos por trocas de blocos de genes por processo referido "*lateral transfer*" conferindo um aumento na habilidade de adaptar-se a novos nichos, causando um amplo espectro de doenças em indivíduos saudáveis (TRABULSI et al., 2002). Cepas de *E.* coli podem causar infecções entéricas e extraintestinais (ExPEC) em humanos. Duas síndromes clínicasextra-intestinais podem resultar da infecção por estes patótipos: infecções do trato urinário (UPEC), sepse/meningite (NMEC).Os patótipos associados a doenças entéricas conhecidos como *E. coli* diarreiogênica (DEC) (TRABULSI et al., 2002) estão resumidos na Tabela 1 abaixo.

Quadro 1- Patótipos de *E. Coli* Diarreiogênicas.

Patógeno	Adesina	Toxina	Doença
ETEC	Fator de colonização (CF) Adesina associada a lesão A/E em suínos (Paa)	Enterotoxina termolábil (LT) Enterotoxina termo estável (ST) Citolisina A (ClyA)	Diarreia aquosa aguda Diarreia do viajante
EAEC	Fimbria de aderência agregativa (AAF) (I, II, III, Hda) Loci A de invasão toxigênica (Tia)	Enterotoxina 1 termo estávelde EAEC (EAST1) Enterotoxina de Shigella (ShET)1 Hemolisina E (HlyE)	Diarreia do viajante Diarreia infantil

STEAEC	AAF Adesina homóloga IrgA (Iha)	Toxina Shiga (Stx)	Intoxicação alimentar
DAEC	Adesina Afimbrial (Afa)ou fimbrial (Dr)	-	Diarreia aguda
AIEC	Fimbria do tipo 1 (TIF) e fímbria longa polar (LPF)	-	Doença de Crohn
EHEC	Intimina Paa Toxina B (ToxB) Fator para aderência em *E.coli*(Efa)-1 LPF Adesina de auto aglutinação de STEC (Saa) Proteína de ligação a imunoglobulina em *E.coli*(EibG) Autotransportadora em EHEC(EhaA) Proteína A de membrana externa (OmpA) Iha	Stx	Intoxicação alimentar
EPEC	Intimina Fímbria do tipo IV (BFP) Paa LPF Iha EhaA	-	Diarreia infantil
EIEC (Shigella)	-	ShEt1/2	Shigelose

Patógeno	Adesina	Toxina	Doença
ETEC	Fator de colonização (CF) Colonization factors (CF) Porcine A/E associated adhesin (Paa)	Heat-labile enterotoxin (LT) Heat-stable enterotoxin (ST) Cytolysin A (ClyA)	Diarreia acuosa aguda Diarreia do viajante
EAEC	Aggregative adherence fimbriae (AAF) (I, II, III, Hda) Toxigenic invasion loci A (Tia)	EAEC heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) Shigella enterotoxin (ShET)1 Hemolysin E (HlyE)	Diarreia do viajante Diarreia infantil
STEAEC	AAF IrgA homolog adhesin (Iha)	Shiga toxin (Stx)	Intoxicação alimentar
DAEC	Afimbrial (Afa)or fimbrial (Dr) adhesins	-	Diarreia aguda
AIEC	Type 1 pili Long polar fimbriae (LPF)	-	Doença de Crohn
EHEC	Intimin Paa Toxin B (ToxB) *E.coli* fator for adherence (Efa)-1 LPF STEC autoagglutinating adhesin (Saa) *E.coli* immunoglobulin-binding protein (EibG) EHEC autotransporter encoding gene A (EhaA) Outer membrane protein A (OmpA) Iha	Stx	Intoxicação alimentar

EPEC	Intimin Bundle forming pili (BFP) Paa LPF Iha EhaA	-	Diarreia infantil
EIEC (Shigella)	-	ShEt1/2	Shiguelose

Para construir esta Tabela usamos os dados da "Table 1- Summary of enteric E. coli pathotypes,publicada por Clements et al., Gut Microbes, 2012".

A primeira associação causa – efeito da cepa enteropatogênica, foi descrita por John Bray em 1945 (BRAY, 1945), quando demonstrou que as EPECs eram a principal causa de diarréia em berçários de Londres. Sabe-se que neonatos podem adquirir EPEC durante os primeiros dias de vida após a transmissão dos patógenos da mãe para o feto via canal do parto ou retal, pelo contato direto com crianças contaminadas e, até mesmo, infectar-se através de adultos assintomáticos ou crianças maiores/maisvelhas que estejam eliminando EPEC, por água ou ar, por fômites e por organismos presentes em fórmulas ou suplementos alimentares. Dentre todas estas prováveis vias, as duas primeiras têm maior relevância, sendo a rota oro-fecal a mais frequente em todos os casos. Recém-nascidos usualmente contraem infecção por EPEC devido ao contato íntimo e prolongado com pessoas que excretam este microrganismo, fato comum em hospitais, grupos familiares e convívio com outras crianças. Em prematuros, a prevalência é maior devido a prolongada estada destes nos hospitais, a constante manipulação dos bebês pelos profissionais da saúde e familiares e pela superpopulação hospitalar, provavelvente em instituições expostas à EPEC (CLEARY et al., 2001; NATARO et al.,1998). Vale ressaltar que a gravidade das infecções intestinais em indivíduos jovens deve-se, principalmente, à formação incompleta da microbiota protetora.

Sabe-se que cepas de EPEC são comuns em comunidades onde as condições sanitárias não são adequadas (FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2000). Portanto, as condições sócio-econômicas são fatores importantes na incidência de

enfermidades diarreicas em indivíduos, especialmente crianças, que vivem no meio rural e em regiões sem saneamento básico. Nesses núcleos populacionais, a manifestação de diarreias ocorre, principalmente, durante os três primeiros meses e permanece elevada após os seis primeiros meses de vida. Esta alta incidência em comparação com regiões industrializadas é atribuída à diminuição do aleitamento materno e à superlotação de hospitais com recém-nascidos susceptíveis, especialmente em países em que o número de partos hospitalares ultrapassa os partos residenciais (CLEARY et al., 2001). A doença em adultos está intimamente associada à ingestão de grandes quantidades de cultivo, estando, em alguns casos esporádicos, associada a outros fatores como diabetes e acloridria (LEVINE et al., 1985; NATARO et al., 1998).

EPEC foi caracterizada pela sua inabilidade de produzir enterotoxinas e de invadir a célula hospedeira como o observado na*Shigella*(DONNENBERG; KAPER, 1992). Estudos recentes, sobretudo com a introdução de métodos de biologia celular e molecular, têm permitido que se obtenham informações sobre os mecanismos de virulência da EPEC (DONNENBERG; KAPER, 1992). A infecção por EPEC geralmente causa formas agudas de diarreia, mas casos severos de doença protraída também são frequentes em crianças (NATARO et al*.,* 1998). Diarreia intensa, aquosa, vômitos e febre são sintomas comuns nesta infecção (NATARO et al*.,* 1998)equase todas as crianças mostram sinais da enfermidade entre 2 a 12 dias após a contato com patógeno, podendo ocorrer em um período curto, de cerca de 24 horas, quando a infecção é naturalmente adquirida. Dados epidemiológicos indicam que indivíduos com idade superior a 2 anos raramente desenvolvem infecção ativa quando em contato com doentes. Obviamente, a exposição à EPEC durante a infância leva à proteção dos indivíduos devido à aquisição de imunidade específica após contato constante com o antígeno, impedindo posteriores reinfecções (LEVINE et al., 1985;SCHRIEFER et al., 1999).

No Simpósio Internacional sobre EPEC realizado em São Paulo em 1995, propôs-se a seguinte definição para EPEC:**"EPEC são *Escherichia coli* diarreiogênicas que produzem uma característica histopatológica conhecida como *attaching and effacing* (A/*E) em células intestinais e não produzem toxina Shiga. EPEC que coloniza humanos possuem um plasmídeo de virulência conhecido como Fator de Aderência a EPEC (EAF*) que codifica a aderência localizada em cultura de célula epitelial mediada pelo *Bundle***

***Forming Pilus* (BFP), enquanto EPEC atípica não possui esse plasmídeo."** (Second International Symposium on EPEC, 1995[1]).

1.2 Estágios da interação entre EPEC e Enterócito

A patogênese da infecção causada por EPEC pode ser dividida em quatro estágios observados em modelos in vitro usando células epiteliais principalmente de origem intestinal e amostras virulentas de EPEC (DONNENBERG; KAPER, 1992; KNUTTONet. al.,1998). Esses estágios são: aderência localizada entre bactérias e célula alvo (AL), injeção de proteínas efetoras pela bactéria na célula alvo, eliminação dos microvilos dos enterócitos, e finalmente, aderência íntima entre bactéria e célula alvo. O primeiro estágio observado in vitro corresponde a aderência inicial da bactéria na célula epitelial intestinal do hospedeiro, realizado por fímbrias de 7 nm de diâmetro que se organizam em estruturas tridimensionais na forma de feixes denominados "pilus" ou "bundle-forming-pili" (BFP). Uma outra contribuição do pilus BFP é entrelaçar-se ligando as bactérias umas as outras (VALLANCE; FINLAY, 2000). A Intimina e, em menor escala, filamentos associados EspA agregam-se nos feixes de "pilus".

A expressão dos componentes bacterianos que participam nesta etapa da adesão bactéria-enterócitos é dependente de genes plasmidiais e cromossomais (DONNENBERG; KAPER, 1992).

Nesta etapa bactérias EPEC formam microcolônias densas aderidas na superfície da célula hospedeira. Esse fenômeno é conhecidocomo Adesão Localizada (AL). AL depende de fatores codificados por genes contidos no plasmídeo EAF (Fator de aderência a EPEC), característicos de EPEC típicas (NATARO et al., 1998). O padrão de AL está caracteristicamente associado aos sorogrupos clássicos de EPEC e diarreia (SCALETSKY et al., 1984). Trabalhos anteriores demonstraram que, anticorpos produzidos contra BFP maduro expresso na membrana externa da célula bacteriana, reconhecem epítopos comuns a estruturas morfológicas semelhantes a fimbria elaborada por diferentes sorotipos de EPEC (GIRÓN et al., 1993; SCHRIEFER et al., 1999), reduzindo a expressão do fenótipo AL. Demonstrou-se, ainda, que soro contendo anticorpos contra BFP

[1]SECOND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPEC, 1995

purificado reduziu significativamente, mas não totalmente, a AL da cepa EPEC B171 (NATARO et al., 1998). Está claro, entretanto, que a aderência de EPEC às células do hospedeiro durante a AL é um processo multifatorial. Numerosas proteínas expressas na superfície de EPEC, incluindo BFP, Intimina, Flagelina e EspA, colaboram na estratégia de colonização, permitindo que EPEC ligue-se ao enterócito sob uma variedade de condições (CLEARY et al., 2004).

Em seguida a aderência inicial, EPEC secreta proteínas efetoras para dentro da célula do hospedeiro através do sistema de secreção tipo III (T3SS) como, por exemplo, EspA, EspB e EspD que participam do segundo estágio, os quais além de interferirem na formação de lesão A/E, também são peças-chave na indução de várias vias de sinalização na célula hospedeira (NATARO et al., 1998). Esse sistema de secreção do tipo III é codificado pelo gene *sep* (secretions of *E. coli* proteins), localizado dentro de uma ilha de patogenicidade cromossomal que possui cinco operons, denominada LEE (LEE1-5) (*Locus of Enterocyte Effacement*), que é considerada uma aquisição evolutiva da bactéria (VALLANCE; FINLAY, 2000; TRABULSI et al.,2002). Os genes responsáveis por LEE podem ser separados em três regiões funcionais distintas: região que codifica o fator T3SS, região que codifica as proteínas efetoras secretadas (*sep*) e suas chaperoninas, e a região que codifica a proteína Intimina e seu receptor Tir (HYLAND et al., 2006).

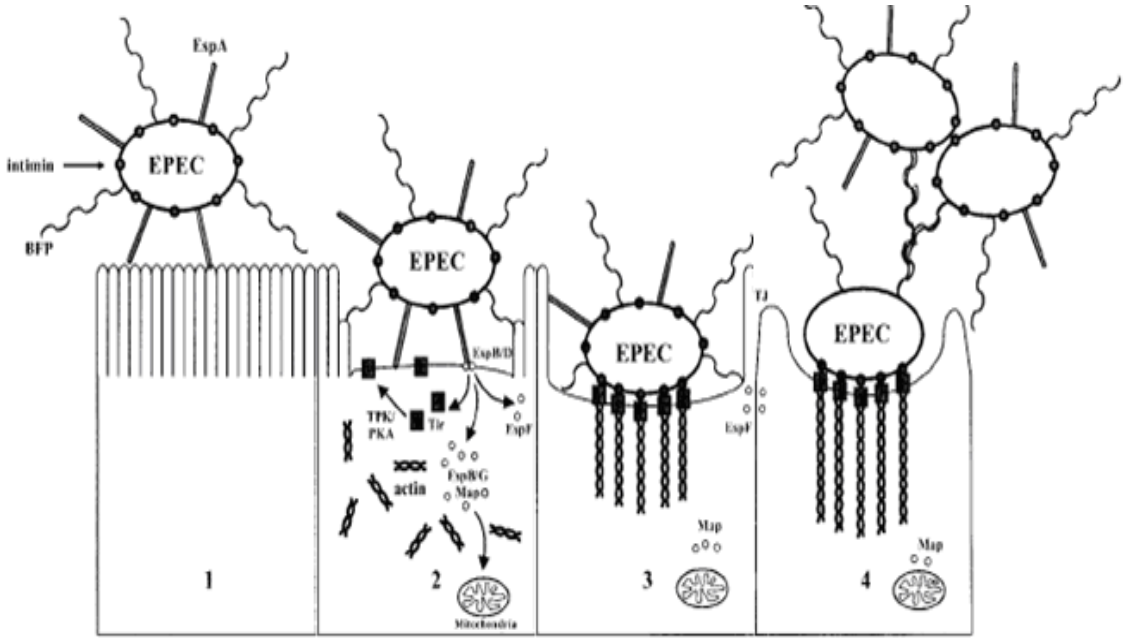
As moléculas efetoras secretadas e ativadas iniciam a transdução de sinais, causando alterações no citoesqueleto da célula-alvo do hospedeiro, resultando na despolimerização da actina e perda das microvilosidades. O receptor Tir (*Translocated Intimin Receptor*, antes denominado *Hp90-Host epithelial protein*) é modificado pela ação das proteínas quinase A e tirosino-quinase e é inserido na célula hospedeira (DONNENBERG; KAPER, 1992). EPEC induz a ativação do *Nuclear Factor-κ*B (NF-*κ*B) e de duas quinases: a proteína quinase C (PKC) e a quinase de cadeia leve de miosina (MLC quinase). A PKC induz alterações no equilíbrio eletrolítico de secreções *in vivo* e *in vitro* e a MLC quinase induz o aumento da permeabilidade das junções intercelulares. A ativação de NF-*κ*B está associada à maior expressão de IL-8 e ao recrutamento de polimorfonucleares (PMN) (NATARO et al., 1998;VALLANCE; FINLAY, 2000).

No terceiro estágio, os filamentos EspA são eliminados da superfície da bactéria, a Intimina liga-se ao receptor Tir (região C-terminal), resultando numa adesão íntima e no acúmulo de actina e de outros elementos do citoesqueleto

(DONNENBERG; KAPER, 1992) como, por exemplo, talina, ezrina, cortactina e vinculina (VALLANCE; FINLAY, 2000; SILVA; SILVA, 2005), abaixo do sítio de aderência da bactéria (DONNENBERG; KAPER, 1992). A Intimina participa na reorganização do citoesqueleto adjacente da célula hospedeira após a ativação das tirosinas quinases. Este evento parece ser necessário para a completa expressão dos efeitos da EPEC no citoesqueleto (DONNENBERG et al., 1992; GOOSNEY et al., 1999). Em voluntários humanos convalescentes de infecção experimental por EPEC, foi observada uma forte resposta imune humoral com produção de anticorpos específicos anti-Intima, sugerindo que esta proteína desempenhe papel importante na virulência da EPEC em humanos (NATARO et al., 1998).

Durante o quarto estágio, o rearranjo de elementos do citoesqueleto na região do enterócito correspondente ao sítio de aderência da bactéria, resulta na formação do pedestal, microestrutura celular característica da infecção por EPEC. Com a indução da formação do pedestal, proteínas efetoras translocadas para a célula do hospedeiro pela EPEC interrompem a função da barreira intestinal, induzem a perda do potencial de membrana mitocondrial, inibem o ciclo celular na fase da transição G2/M e ocasionam morte celular por apoptose. O resultado desses processos é uma intensa reação inflamatória, caracterizada pela produção de IL-8 e migração de PMN para o local da infecção (CLEARY et al., 2004).

Figura 1 – Esquema dos quatro estágios da patogênese de EPEC.



Fonte: CLARKEet. al., 2003.

1.3 BfpA

A aderência localizada (AL) da EPEC depende de genes cromossomais e de um conjunto de genes *bfp* em um plasmídeo de cerca de 92 kb denominado plasmídeo EAF (Fator de aderência à EPEC) (BALDINIet al., 1983; GIRÓN; SCHOOLNIK, 1991). O Bfp, originalmente descrito por Girón e colaboradores (GIRÓNet al., 1993), é uma fimbria longa, flexível, composta de estruturas semelhantes a cordas entrelaçadas e expressa na superfície bacteriana como agregados alinhados lateralmente, pertencente ao grupo de fímbrias e de pilus do tipo IV, de acordo com a análise de sua sequência de proteínas e morfologia (BLANKet al., 2000). Este conjunto ações pode ser parcial ou totalmente responsável pelo fenótipo da AL; participa no recrutamento da bactéria direcionando-a para a célula hospedeira (GIRON et al., 1993).

De acordo com dados de biossíntese e de morfologia, o Bfp é classificado como membro de uma família de fímbriatipo IV, que consiste em subunidades de homopolímeros de 15-20 kDa, compostas por uma cadeia N-terminal hidrofílica com um resíduo de glicina invariável seguido por um conjunto de aminoácidos hidrofóbicos altamente conserváveis e duas cisteínas invariáveis na região C-terminal (CRAIG, 2008). Asfimbrias do tipo IV podem ser divididas em dois grupos: tipos IVa e IVb. Essa divisão é baseada na diferença de tamanho, a IVa é menor que a IVb. Além disso, mais de 40 genes são requeridos para a biossíntese da tipo IVa, enquanto apenas 12 genes são requeridos para a produção da tipo IVb.A principal subunidade do Bfp, conhecida como BfpA, agora chamada de "*bundlin"*, possui 19,5 kDa e é codificada pelo gene *bfp*A e classificada entre as fimbrias do tipo IVb. Nove alelos de *bfp*A foram identificados até agora e 80% deles compartilham sequências. Esses alelos são divididos em grupos α e β e exibem considerável variabilidade imunogenética, tanto em humanos quanto em roedores, sugerindo que a resposta imune específica para *bfp*A afete susceptibilidades individuais à infecção por EPEC. Por outro lado, esta resposta imune seletiva pode ser responsável pelas divergências nas sequências do gene *bfp*A de EPEC (BLANK et al., 2000; BLANK et al., 2003; FERNANDES; DONNENBERG,2007).

Proteínas BfpA são polimerizadas por um mecanismo complexo, composto de quatro componentes, todos encontrados no pili tipo IV. São eles: BfpP, peptidase de membrana interna que cliva um peptídeo N-terminal, BfpD, uma ATPase que

potencializa a polimerização, BfpE, um proteína integral de membrana que recruta o BfpD, e BfpB, uma proteína de membrana externa através da qual o BfpAtransfere-se para a membrana externa (CRAIG, 2008). Para a total biogênese do BFP são necessárias mais sete proteínas: BfpC, BfpG, BfpI, BfpJ, BfpK, BfpL e BfpU, cujas funções ainda não estão bem definidas. Todas essas proteínas são encontradas no pEAF.

A tendência do Bfp agregar-se sugere um mecanismo para a formação de microcolônias de EPEC conhecida como AL (aderência localizada). Como visto em experimentos de aderência de EPEC em células HEp-2: EPEC sem o plasmídeo EAF adere difusamente depois de um longo tempo de incubação em cultura de células HEp-2 (KNUTTON et al.,1989). Além disso, EPEC quando em cultura, sob condições de indução da expressão de BFP, se auto-agrega (AA) (VUOPIO-VARKILA; SCHOOLNIK,1991). Anticorpos específicos anti-BFP reduzem, significativamente, a AL de EPEC nas células do hospedeiro (GIRÓN; SCHOOLNIK, 1991). Outros fatores podem estar envolvidos na formação das microcolônias de EPEC, como curli e celulose, componentes importantes da matriz extracelular. Esses fatores, em conjunto, promovem a formação de um biofilme e potencializam a aderência das células epiteliais intestinais *in vitro* (SALDANA et al., 2009).

Existem diferenças entre as afinidades por receptores entre diferentes alelos. Alelosα-bfpA têm preferência por um receptor de enterócito que contém uma sequência glicosilada de N-acetil-lactosamina (LacNAc). Esta diferença foi confirmada quando conjugou-se LacNAc ao BSA. Essa combinação inibiu a formação de LA de EPEC α-bfpA em células Hep-2 tão bem quanto em biópsias de intestino de adultos e crianças (VANMAELE et al., 1999). Com uma mutação no gene α-bfpA de E2348/69 houve a perda do fenótipo AL. Scaletsky e colaboradores demonstraram que N-acetilgalactosamina inibiu AL de EPEC em células HeLa (SCALETSKY et al., 1988). Além disso, mais sacarídeos tetra e penta fucosilados, presentes no leite materno inibiram a aderência de EPEC em células Hep-2 (CRAVIOTO et al., 1991). Já o alelo β-bfpA não se liga a LacNAc, esses alelos unem-se a glicanos isolados do leite materno humano (HUMPHRIES et al., 2009). Fosfolipídeos estão sendo identificados como potenciais receptores para BFP. Sabe-se ainda, que EPEC liga-se a fosfatidiletanolamina de maneira específica e dose dependente (BARNETT et al., 1999).

1.4 Intimina

Em 1985 foi descrita uma adesina de 94 kDa, uma proteína de membrana externa encontrada em EPEC. Naquela época, acreditava-se que essa proteína era produto do plasmídeo EAF, pois era consistentemente observada em isolados de EPEC que continham o plasmídeo, e não em isolados curados do plasmídeo (LEVINE et al., 1985).

Mais tarde, McDaniel et al. (1995) demonstraram a existência de um *locus* cromossomal chamado LEE (*locus of enterocyte effacement*) que codifica as proteínas envolvidas na lesão A/E, e mostraram que esta região é conservada em patógenos intestinais que produzem a lesão A/E (EPEC, EHEC, *E. coli* diarreiogênica de coelhos (RDEC-1), *Escherichia albertii* e *Citrobacter freundii* biotipo 4280)

O gene *eae* de diversos isolados de EPEC foi clonado e sequenciado demonstrando que a região 5'-terminal é altamente conservada, mas a região 3'-terminal desta proteína apresentava uma composição variável (FRANKEL et al., 1994). Essa proteína é constituída por 939 aminoácidos (aa) altamente conservados na região N-terminal (aa 330 – 659), e variáveis nos últimos 280aa da região C-terminal, onde encontra-se o domínio de ligação da Intimina ao seu receptor Tir. Sabe-se que existe grande similaridade entre as intiminas e invasinasno que se refere à região detentora da atividade de ligação à célula hospedeira, localizada nos 280 resíduos de aa da porção C-terminal (FRANKEL et al., 1994). Essa região variável define os tipos e subtipos de intimina, que são conhecidos pelas letras do alfabeto grego como α, α2, β1 a –3, γ1, γ2, δ, ε, ε2 a–4, ζ, η, η2, θ, ι, ι2, κ, λ, ν, ξ, o, π, ρ e σ (BEUTIN et al., 2004; BLANCO et al., 2004, 2006; RAMACHANDRAN et al., 2003; ZHANG et al., 2002).

Considerando-se a molécula inteira (939aa), existe identidade de aproximadamente 80% entre as sequências de aminoácidos das intiminas α, β e γ, e de 90% quando são consideradas apenas as porções finais das regiões N-terminais (aa 330-659). Esses dados indicam pequena variação relativa entre essas regiões de intimina. A Intimina é composta de cinco domínios funcionais: um domínio N-terminal ancorado na membrana externa da bactéria, incluindo os aminoácidos inseridos na região periplasmática (PP) e transmembrânica (TM), e quatro domínios

extracelulares denominados: D0 (559-657), D1 (658-751), D2 (752-841) e D3 (842-939) (LUO et al., 2000).

Portanto, em face desta diversidade, o possível alvo comum para uma provável vacina anti-EPEC foi identificado como a região conservada de intimina que compreende os aminoácidos 388-667 ($Int_{388-667}$) (ADU-BOBIE et al., 1998).

Batchelor et al. (1999) produziram um antissoro em coelhos para a detecção de todos os tipos de intimina conhecidos na época através da clonagem, expressão e purificação dos 280 aa entre Gly388 a Lys667 do gene *eae* de EPEC E2348/69. O antissoro obtido foi utilizado em ensaios de *immunobotting*, *immunogold* e imunofluorescência. Este antissoro mostrou alto grau de reatividade para diferentes isolados de EPEC, reconhecendo os tipos α, β, γ, e δ de intimina.

1.5*Mycobacterium smegmatis*

Vacinas de segunda geração, usadas como uma nova abordagem, incluemo uso de vírus ou bactérias recombinantes que expressam antígenos de interesse. As bactérias BCG, *M. smegmatis*, *Salmonella* t*yphimurium* e *Listeria monocytogenes* ou vírus (*vaccinia* vírus) são atualmente utilizados como vetores de expressão e sistemas-adjuvantes. A utilização destes microorganismos visa atrair células para o sítio da imunização e induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, IFN-γ (GARBE et al., 1993).

A bactéria *Mycobacterium smegmatis* foi isolada pela primeira vez por Alvarez e Travel (1885). Apesar de ser membro da família *Mycobacterium*, *M.Smegmatis* é uma micobactéria não patogênica de crescimento rápido, podendo propagar-se em gerações a cada 1-3 horas. Possui baixa virulência e pode ser transformada efetivamente com muitos genes *in vitro* (GICQUEL, 1994). Possui poderosa capacidade adjuvante, já utilizada como modelo vacinal para *M. tuberculosis* e para genes de outros patógenos, apresentando um alto nível de expressão. Diferente de outras espécies de micobactérias, como o BCG que sobrevive nas células do hospedeiro por inibição do amadurecimento do fagossomo, o *M. smegmatis* é rapidamente destruído pelas proteases dos fagossomos de células infectadas, facilitando uma rápida absorção dos antígenos expressos. Além disso, *M. smegmatis* induz resposta immune humoral e celular similares (YADAV et al., 2004).

M. smegmatis recombinante (r*Smeg*) tem sido usada como adjuvante na prevenção e tratamento de várias doenças como Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), Hepatite B e na imunoterapia contra o câncer (YADAV et al., 2004). Em outro estudo mostrou-se que a *rSmeg* expressando uma proteína de membrana da *Helicobacter pylori* conferiu proteção em camundongos após desafio com a bactéria (YADAV et al., 2004). Mais recentemente, foi publicado um trabalho em que a imunização com o r*Smeg* expressando duas proteínas de *M. tuberculosis* fundidas, conferiu a mesma proteção que o BCG em camundongos desafiados com *M. tuberculosis* (ZHANG et al., 2010), tornando-se um bom candidato para substituição do BCG. No entanto, até o momento, nunca tinha sido testada uma forma de imunização utilizando-se o *rSmeg* como vetor de expressão para antígenos de EPEC.

Estudos recentes, analisando a estrutura e imunogenicidade de proteínas recombinantes obtidas de micobatérias de rápido crescimento, como é o caso do *M. smegmatis*, têm demonstrado superioridade sobre a mesma proteína purificada de sistema de expressão em *E. coli* (FERNANDO; BRITTON, 2006; JEONG; LEE, 2008). Entretanto, esse sistema apresenta obstáculos. O primeiro é a inabilidade em regular a expressão das proteínas recombinantes em *M. smegmatis*, como se consegue com o promotor Lac em *E. coli* (WIKER et al., 2010); o segundo é que o sistema de purificação ainda não está totalmente descrito e adaptado.

1.6*Mycobacterium bovis* BCG

O bacilo Calmete-Guérin (BCG) é uma cepa de *Mycobacterium bovis* que foi atenuada entre os anos de 1906 a 1920. Em 1928, BCG foi recomendado pela Liga das Nações como a vacina oficial contra tuberculose humana (TB). BCG é a vacina mais usada em todo o mundo, somando mais de três bilhões de pessoas vacinadas até hoje (BLOOM et al., 1992). No Brasil, a vacina é administrada uma única vez no primeiro mês de vida pela via intradérmica (MEDERLE et al., 2002).

BCG oferece vantagens exclusivas: não é afetada por anticorpos maternos, por isso pode ser administrada logo após o nascimento, geralmente uma única dose confere uma longa imunidade, sendo segura e estável,é de baixo custo de produção, e exerce ação adjuvante através de componentes da parede celular (STOVER et al., 1991).

O interesse em BCG tem crescido muito na última década pelo desenvolvimento de diferentes sistemas genéticos para expressão de antígenos em micobactérias. Como resultado, antígenos de bactérias, parasitas e vírus têm sido expressos em BCG, e essas cepas de BCG recombinantes produzem resposta imune humoral e celular contra antígenos heterólogos. STOVER e colaboradores (1991) construíram plasmídeos vetores para expressão de proteínas heterólogas em micobactérias com a expressão desses antígenos modulada pelo promotor. Vários promotores têm sido utilizados para que funcionem em *E.coli* e em micobactérias, como o promotor β- lactamase pBLAF* derivado do plasmídeo pAL5000 isolado de *M. fortuitum* (MATSUO et al., 1990; TIMM et al., 1994).

A dose do BCG é crucial para a determinação da resposta imune Th1/Th2 em camundongos. Baixas doses induzem quase que exclusivamente resposta imune Th1, enquanto altas doses induzem uma resposta mista Th1 e Th2 (POWER et al., 1998). Esses dados sugerem que BCG possa ser um bom vetor de expressão de antígenos heterólogos, mas cada antígeno deve ser avaliado individualmente quanto ao sistema de expressão, dose, via de administração, níveis e estabilidade da expressão e localização celular (BASTOS et al., 2009).

A razão para usar BCG como vetor para entrega de antígenos heterólogos ao sistema imune, baseia-se na sua função adjuvante e também na sua capacidade de replicar-se dentro das células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas (DC). O fato de BCG sobreviver e replicar-sedentro das APC faz com que essas células apresentem tanto o BCG quanto os antígenos heterólogos, iniciando assim, a resposta imunológica (NASSER et al., 2005).

A proteção induzida por BCG recombinante (rBCG) tem sido descrita em outros estudos, como a expressão do antígeno de *S. mansoni*, Sm14 em BCG , que induziu a produção de IFN-γ e resposta celular, predominalmente Th1, em modelo camundongo BALB/c (VARALDO et al., 2004).

1.7 Administração de vacinas pela via oral

O método de imunização mais conveniente no âmbito sócio-econômico é a vacinação oral. A facilidade de aplicação, o fato de ser pouco invasiva e de apresentar reduzidos efeitos colaterais, como os comumente observados após imunizações parenterais, são algumas das suas vantagens frente a outras vias de

inoculação. Inicialmente, acreditava-se que a geração da imunidade em mucosas ocorria através de imunização tópica; todavia, vacinas intramusculares ou subcutâneas conferem baixa proteção comparadas às imunizações pelas vias nasal ou oral, especialmente quando a porta de entrada do agente infeccioso é o trato gastrointestinal. São poucas as vacinas licenciadas para a aplicação oral, entre elas estão as vacinas contra a poliomielite e rotavírus, ambas contendo os vírus atenuados e apresentando alta imunogenicidade (CERUTTI, 2008).

Entretanto, existem limitações para a imunização oral, como as alterações causadas nos epítopos durante o tráfego pelo trato gastrointestinal, e variações no tempo de exposição e captura dos mesmos. Fatores ambientais como a acidez elevada e a ação de proteases podem levar a alterações e desnaturações dos epítopos, com subsequente precipitação do antígeno na luz intestinal, diminuição da afinidade para a superfície das células M e ocupação das placas de Peyer por peptídeos-epítopos inativos, prejudicando o desenvolvimento da resposta imunológica. Ainda, as imunizações pela via oral são eficientes por um curto período, sendo necessárias várias doses para estimular e manter a resposta imune. Obviamente, há possibilidade de indução de tolerância dependendo das concentrações, das doses administradas, dos intervalos entre imunizações e do uso de adjuvantes (CERUTTI, 2008; SHALABY, 1995).

Nesse contexto, o desenvolvimento de vacinas administradas pela via oral visa facilitar a captura dos antígenos pelas células M, aumentar a capacidade fagocítica das APC, modular a proliferação de linfócitos B e T antígeno-específicos e proteger o antígeno contra a degradação enzimática, aumentando sua imunogenicidade e garantindo imunidade prolongada e sistêmica (SHALABY, 1995).

1.8 Sílicas mesoporosas altamente ordenadas

As sílicas mesoporosas são partículas de óxido de silício (SiO_2) com estrutura altamente organizada que, devido às suas propriedades físico-químicas, apresentam potencial de aplicação em diferentes áreas. Esses materiais são capazes de interagir com átomos, íons e moléculas, não apenas em sua superfície, como também em seu interior (KRESGE et al., 1992; YANG et al., 1997).

Descrita em 1998, a sílica mesoporosa SBA-15 apresenta estrutura hexagonal com poros de aproximadamente 10 nmaltamente ordenados e

interligados, asparedes são relativamente espessas e proporcionam notável estabilidade térmica, hidrotérmica e mecânica (MATOS et al., 1992; ZHAO et al., 1998). A SBA-15 é sintetizada em meio ácido, utilizando como agente direcionador de estrutura um copolímero tribloco, o poli (óxido de etileno) –poli (óxido de propileno)-poli (óxido de etileno) (EO20PO70EO20), que pode auto-agregar-se com espécies de silicatos formando a sílica mesoporosa (ZHAO et al., 1998).

Apesar dos vários estudos voltados para a utilização de sílicas como veículo para diferentes substâncias, essas não haviam sido testadas quanto à capacidade de ativar eficientemente as APC, carrear e liberar imunógenos (CARVALHO, 2007).

O primeiro estudo sobre a viabilidade de emprego desse material nanoestruturado como adjuvante da imunidade foi realizado no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, empregando-se a sílica mesoporosa SBA-15. Verificou-se que camundongos isogênicos BALB/C e geneticamente selecionados para a baixa produção de anticorpos (L_{III}) imunizados com Intimina 1*β* (proteína de *E. coli*) ou veneno total da serpente *Micrurus ibiboboca* encapsulado a SBA-15 apresentaram aumento significativo dos títulos de anticorpos específicos para a proteína e para o veneno da serpente, sendo a resposta secundária semelhante ou mais elevada comparativamente aos animais imunizados com esses imunógenos em AIF ou $Al(OH)_3$ (MERCURI et al., 2006). Verificou-se, ainda que a sílica SBA-15 foi capaz de modular positivamente a resposta imune humoral de camundongos maus respondedores (L_{III}), os quais após imunizações com soro albumina bovina (BSA) pelas vias oral ou intramuscular passaram a produzir títulos de IgG semelhantes aos bons respondedores (H_{III}) (CARVALHO, 2007). Esses dados, em conjunto, indicam a participação da SBA-15 na ativação do sistema imunológico e na indução de memória, mecanismo essencial para a proteção induzida por processos de vacinação.

Em 12 de setembro de 2005 foi depositada a Patente *COMPLEXO IMUNOGÊNICO FORMADO POR ANTÍGENOS VACINAIS ENCAPSULADOS POR SÍLICA MESOPOROSA NANOESTRUTURADA,* em parceria com o Laboratório Cristália, que recebeu o número PI 0503817-0 e, em setembro de 2007, foi encaminhado seu depósito internacional.

1.9 Epidemiologia

EPEC foi o primeiro grupo de *E. coli* descrito a causar diarreia, isto ocorreu em 1945, quando EPEC foi isolada na Grã Bretanha, num surto de diarreia infantil, com índice de mortalidade média superior a 50% Este índice de mortalidade foi reduzido para 10-20% em decorrência de progressos nas condições sanitárias e na conscientização da população (OCHOA et al., 2008), em comparação com outros patógenos típicos como *Shigella, Giardia, Salmonella* ou rotavírus (MATHEWSON et al., 1987). Nos países em desenvolvimento, infelizmente, os índices de mortalidade causados por EPEC têm aumentado.

Estudos realizados em países da América Latina e México demonstraram que EPEC e ETEC são os principais patógenos isolados em casos de diarreia infantil (FRANZOLIN et al., 2005).No Chile o quadro epidemiológico é semelhante ao do México (VIDAL et al., 2007) e, na China 5% dos casos são causados por EPEC (KAIN et al., 1991). No México, EPEC é responsável por 17-19% dos casos de diarreia infantil; isso indica que de cada cinco crianças hospitalizadas com a diarreia, uma está infectada com EPEC (VIDAL et al., 2007).

No Brasil, cepas de EPEC mostraram significante associação com diarreia infantil em um hospital em São Paulo (SCALETSKY et al., 1999), em crianças de até cinco anos de idade em um hospital em Rondônia (ORLANDI et al., 2006) e também foram um dos patógenos mais prevalentes em crianças com diarreia na Bahia (BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005). Em um estudo de detecção de DEC em amostras de crianças com diarreia no Espírito Santo, 30,3% foram positivos, dentre eles 5,5% de aEPEC e 4,6% de tEPEC (SPANO et al., 2008).

Na Tanzânia, as *E. coli* diarreiogênicas apresentaram uma prevalência de 22,9%. Dentre elas as EPEC tiveram uma positividade de 4,6%, a maioria tEPEC (92,3%) (MOYO et al., 2007).

Nas escolas da Índia, em crianças com diarreia aguda; as *E. coli* diarreiogênicas representaram 41% de todos os patógenos isolados. Dentre as DEC, as EPEC tiveram uma prevalência de 26,2% e a EHEC de 1,9% (ANVIKAR et al., 2008). No Vietnã, das 64 DEC isoladas, 9,2% eram AEEC e 2,8% eram EPEC (HIEN et al., 2008). Em outra investigação, em amostras de crianças com diarreia aguda no Irã foi encontrada a prevalência de 12,6% de EPEC (JAFARI et al., 2009).

Embora EPEC não seja considerada um patógeno comum em países desenvolvidos, surtos e casos esporádicosforam relatados na Finlandia, nos Estados

Unidos (KOTLER et al., 1993), Alemanha (5,9%) e Austrália (7,6%) (BEUTIN et al., 2003). A tabela 2 resume alguns estes dados epidemiológicos.

Tabela 1 – Prevalência de EPEC em crianças com diarreia em países em desenvolvimento

Country	Sample collection period	Children's age (years)	No. of samples	EPEC[a] n (%)	EPEC type	
					Typical[b] n (%)	Atypical[c] n (%)
Tanzania	1996–1997	<5	451	24 (5.3)	9 (37.5)	15 (62.5)
Thailand	1996–2000	<12	2629	85 (3.2)	24 (28.2)	61 (71.8)
Mozambique	1998–1999	<7	548	13 (2.4)	4 (30.8)	9 (69.2)
Brazil	1998–1999	<2	237	34 (14.3)	21 (61.8)	13 (38.2)
Mongolia	2001–2002	<16	238	9 (3.9)	5 (55.6)	4 (44.4)
Brazil	2001–2002	<5	175	13 (7.4)	1 (7.7)	12 (92.3)
Vietnam	2001–2002	<5	587	39 (6.6)	0 (0)	39 (100.0)
Mexico	2000–2004	<5	430	16 (3.7)	3 (18.7)	13 (81.3)
Tunisia	2001–2004	<15	115	6 (5.2)	2 (33.3)	4 (66.7)
Brazil	2002–2003	<5	446	25 (5.6)	2 (8.0)	23 (92.0)
Chile	2004–2005	<9	509	54 (10.6)	14 (25.9)	40 (74.1)
Peru	2006–2007	<1	461	18 (3.9)	2 (11.1)	16 (88.9)
Iran	ND[d]	<10	247	45 (18.2)	29 (64.4)	16 (35.6)

[a] Detected by PCR.
[b] Typical EPEC: *eae+/bfpA+*.
[c] Atypical EPEC: *eae+/bfp−*.
[d] ND: no data.

Fonte: Modificado de Ochoaet al. (2008).

1.10 Imunologia das Mucosas

O epitélio da mucosa intestinal bloqueia a invasão de patógenos, tanto pela presença de uma importante barreira física quanto pela proteção imunológica constituída, essencialmente, por anticorpos neutralizantes da classe IgA. A proteção epitelial é sofisticada, contendo uma vasta comunidade de bactérias comensais que processam ingredientes fundamentais, sintetizam vitaminas, estimulam a maturação do sistema imunológico e formam um nicho ecológico que previne o crescimento de espécies patogênicas (CERUTTI et al., 2008). Quantitativamente, o intestino é o órgão efetor mais importante da imunidade humoral, mostrando-se responsável por cerca de 80% da produção total de imunoglobulinas, sendo que desse total, 80 a 90% pertencem à classe IgA, imunoglobulinas geradas principalmente por plasmócitos presentes nas placas de Peyer (PP), aglomerados de nódulos linfóides bem definidos localizados ao longo do intestino delgado, e linfonodos mesentéricos (MLN) (KELSALL; JOHANSSON, 2005).

Microorganismos comensais e antígenos provenientes da alimentação estimulam constantemente o sistema imunológico da mucosa intestinal, culminando na produção de anticorpos por mecanismos dependentes ou independentes de

linfócitos T. O principal mecanismo de defesa das mucosas envolve a imunoglobulina A (IgA). Essa classe de anticorpos trabalha junto com fatores físicos como o muco, bloqueando a adesão de bactérias às células epiteliais sem causar danos aos enterócitos ou inflamação local.

Em cada região da mucosa do organismo prevalecem tipos diferentes de anticorpos. No intestino prevalecem a IgA, com uma pequena colaboração de IgM e IgG. A presença desses anticorpos, especialmente os neutralizantes da classe IgA, auxiliam na manutenção do equilíbrio da flora intestinal, impedindo que patógenos penetrem na mucosa e facilitando a captura dos mesmos pelas células M e APC intestinais (CERUTTI, 2008). Dessa forma, espera-se que os processos de vacinação pela via oral resultem no estímulo à produção de anticorpos protetores da mucosa intestinal e, sobretudo, na indução de memória imunológica específica.

Tanto em camundongos quanto em humanos, as secreções das mucosas contêm dímeros de imunoglobulina A (IgA), originados da interação entre monômeros de IgA e a cadeia J, um peptídeo sintetizado por plasmócitos. A ligação desses componentes ao receptor polimérico de imunoglobulinas (pIgR), expresso nas células epiteliais da mucosa em suas superfícies basal e lateral, e ao componente secretor originado da clivagem do pIgR permite a passagem da IgA para a luz intestinal por transcitose e confere à IgA secretada (s-IgA) propriedades mucofílicas importantes para a proteção do organismo contra patógenos (CERUTTI, 2008; PHALIPON et al., 2002). Em camundongos, a IgA circulante compreende cerca de ¼ do total de imunoglobulinas do soro; encontra-se, principalmente, na forma polimérica e não existem subclasses como o relatado em humanos. A IgA sistêmica liga-se a diversos receptores expressos em granulócitos, monócitos, macrófagos, DC, eosinófilos, DC foliculares e hepatócitos, facilitando a internalização de bactérias opsonizadas. Pouco se sabe sobre esses receptores, supondo que atuem num contexto não-inflamatório na defesa contra bactérias intestinais. Por outro lado, a s-IgA das secreções mucosas têm o papel fundamental de ligar-se a microorganismos e toxinas presentes na luz intestinal, neutralizando-as e bloqueando a entrada de patógenos no hospedeiro. Na vacinação oral, a produção desses anticorpos é o principal mecanismo de indução de imunidade protetora (CERUTTI, 2008).

Linfócitos B, precursores de plasmócitos secretores de anticorpos, podem responder a antígenos, como polissacarídeos e lipopolissacarídeos, de maneira T-

independente a partir da ligação direta das imunoglobulinas expressas na sua superfície, levando a uma rápida resposta de anticorpos; ou de modo dependente de linfócitos T auxiliares (Th) através da interação CD40/CD40L e da influência de citocinas (VOS et al., 2000).

Através dos seus receptores (TCR), os linfócitos T reconhecem antígenos processados e ligados às moléculas codificadas pelos genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), expressas nas superfícies celulares. As moléculas de MHC classes I e II associadas a peptídeos antigênicos estimulam, através da interação com os co-receptores CD8 e CD4, linfócitos T citotóxicos (CTL) e T auxiliares (Th), respectivamente. Após ativação, expansão clonal e diferenciação, os linfócitos T assumem funções efetoras diferenciadas dependendo dos estímulos que recebem e do micro-ambiente em que se encontram (LEBIEN; TEDDER, 2008).

Linfócitos T citotóxicos contribuem principalmente para a eliminação de patógenos intracelulares e células tumorais, enquanto linfócitos T auxiliares atuam na proliferação e diferenciação de linfócitos B e T, macrófagos e DC. Linfócitos Th dividem-se em célulasdo tipo Th1, responsáveis pela proteção contra patógenos intracelulares caracterizada pela expressão de interferon-γ (IFN-γ), reações de hipersensibilidade celular do tipo tardio, e doenças autoimunes; linfócitos Th2 participam de hipersensibilidade humoral do tipo imediato e da proteção contra patógenos extracelulares, exotoxinas bacterianas e helmintos, desenvolvendo uma resposta mediada por anticorpos e expressão de citocinas como IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13; linfócitos Th3, responsáveis pela secreção de TGF-β e pela regulação da resposta imune no nível das mucosas.

A subpopulação Th17, que secreta a citocina pró-inflamatória IL-17, atua na proteção contra patógenos extracelulares e fungos, além de interferir em processos autoimunes; e os T reguladores (T_{REG}) que apresentam função supressora controlando doenças autoimunes, alergias, infecções e câncer (AFZALI et al., 2007; AKDIS; OZDEMIR; AKDIS, 2009; COFFMAN, 2006).

O uso de adjuvantes nos processos de vacinação, método mais eficiente na proteção contra patógenos, pode gerar reação inflamatória local e levar ao desenvolvimento da resposta imune adquirida. Os processos imunológicos desencadeados pela imunidade adquirida permitem a troca de classes de imunoglobulinas, maturação de afinidade dos anticorpos e a formação de memória

imunológica, fundamental na proteção do organismo contra exposições subsequentes ao mesmo antígeno (JONSDOTTIR et al., 2008).

1.11 Tecidos linfóides associados a mucosa

Existem diferentes tecidos linfóides associados a mucosa (MALT). Dentre eles, destaca-se o tecido linfóide associado ao intestino (GALT). Fazem parte do GALT as placas de Peyer (PP), os linfonodos mesentéricos (MLN), os linfócitos e APC presentes na lâmina própria (LP) intestinal.Linfócitos T e B e, em menor quantidade macrófagos e DC, encontram-se em grandes quantidades em todos esses tecidos, onde são estimulados por antígenos para sua expansão e diferenciação.

Como referido acima, as placas de Peyer são conjuntos de folículos linfóides; encontram-se separadas da luz intestinal por uma única camada de células do FAE (*Follicle Associated Epithelium*), atuando principalmente na captura de bactérias e vírus patogênicos. Pouco se sabe sobre a ligação desses microorganismos com as células M encontradas no FAE, portas de entrada para antígenos presentes na luz intestinal, mas acredita-se que a captura ocorra de modo seletivo, com base nas propriedades físico-químicas das partículas capturadas (SMITH et al., 1998).

A localização das placas de Peyer varia conforme a espécie; em camundongos essas estruturas são maiores e mais numerosas na região distal do intestino delgado ocupando principalmente o íleo. O tamanho pode variar de 1,5 a 3,0 mm de diâmetro dependendo do número de agregados de folículos linfóides. As placas menores são formadas por cerca de 2 folículos, já as maiores chegam a ter até 8 folículos linfóides. Essas placas podem ser observadas logo no início da vida fetal, aproximadamente após a 11ª semana de gestação, entretanto, o desenvolvimento do centro germinativo só é observado após o nascimento, o que reflete a dependência do ambiente para a hiperplasia folicular. Assim, essas estruturas aumentam de tamanho e número conforme a idade, atingindo seu ápice na puberdade e decaindo na idade adulta (BRANDTZAEG; JOHANSEN, 2005). Nas placas de Peyer inicia-se a resposta imune contra patógenos a fim de que a microbiota local se mantenha e o organismo proteja-se contra infecções. Em seus centros germinativos, ocorre a interação entre linfócitos B e T além da mudança de isótipo de imunoglobulinas, síntese e secreção de anticorpos da classe IgA devido

ao microambiente rico em citocinas como IL-4, IL-6, IL-10 e TGF-β que auxiliam a expansão clonal de plasmócitos produtores desses anticorpos. Ainda, dados recentes indicam que o ácido retinóico (RA) e a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) participam da mudança de classe, estimulando a migração de células B e a diferenciação em plasmócitos, aumentando os níveis de IgA secretada. A principal proteção ao indivíduo é oferecida pela IgA secretada (s-IgA) para a luz intestinal produzida, inclusive, no contexto não inflamatório e independente de linfócitos T (CERUTTI; RESCIGNO, 2008; MORA et al., 2006).

Células M são célulasepiteliais especializadas que residem predominantemente no FAE, sobrejacente as placas de Peyer, mas também podem residir em outras áreas do trato intestinal como cólon e reto (HATHAWAY; KRAEHENBUHL, 2000). Apenas uma célula em cada dez milhões de células epiteliais no trato intestinal é uma célula M, isto corresponde a 5% em humanos e 10% em camundongos (KUOLEE; CHEN, 2008). Elas são identificadas por sua superfície apical achatada, menor número de lisossomos, grande número de mitocôndrias e ausência de glicocálix cobrindo sua superfície, além disso células M de camundongos expressam marcadores específicos como β1 integrina ou lectina L-fucose (DONNENBERG; KAPER, 1992).Ao contrário dos enterócitos, estas células capturam antígenos ou microrganismos do lúmen intestinal por fagocitose, endocitose ou pinocitose e transicitose, e entrega-os ao sistema imune sob a mucosa. Células M não são restritas somente ao GALT, podem também serem encontradas em tecido linfoide associado à nasofaringe (NALT), tecido linfoide associado aos brônquios (BALT)e tonsilas.

A habilidade das células M em capturar diversos microrganismos e antígenos no lúmen intestinal e transportá-los até as APCs tem colocado-as em destaque como alvo ideal para entrega de vacinas para o sistema imune de mucosa.Como mencionado anteriormente o número de células M no organismo é baixo, mas este número aumenta após exposição a antígenos, como por exemplo, *Streptococcus pneumonia* R36a. No entanto, esse aumento de células M faz com que haja aumento da captura de todos os antígenos e não somente os de interesse, consequentemente, aumentando a probabilidade de indução de alergias a comida e doenças inflamatórias (KUOLEE; CHEN, 2008).

Receptores alvos específicos na superfície apical das células M pode ter a habilidade de aumentar a captura e transporte de antígenos, consequentemente

iniciando a resposta imune e induzindo proteção contra agentes infecciosos. Alguns importantes PRRs como o TLR-4, PAFR e α5β1integrina são encontrados na superfície de células M em humanos e camundongos. Marcadores específicos como glicoproteína 2 (GP2) que se liga especificamente a um pili tipo 1 de membranas externas de bactérias (FimH) também são encontradas em células M de humanos e camundongos (HASE et al., 2009).

As DC das mucosas iniciam a resposta imune contra patógenos e controlam a atividade de células T reguladoras bem como a tolerância oral, participando ativamente na indução, manutenção e regulação negativa das inflamações da mucosa induzidas por alergias e processos crônicos (IWASAKI; KELSALL, 2008; KELSALL; JOHANSSON, 2005). Nas placas de Peyer existem sub-populações distintas de DC, todas tendo como marcador de superfície o receptor $CD11c^{HIGH}$. São fundamentais na captura de antígenos protéicos e na apresentação antigênica. Essas células têm meia vida de 3-5 dias.

Os diferentes subtipos de DC expressam funções bem delimitadas dependendo da sua localização e da possibilidade de contato com antígenos e com linfócitos B e T. Duas sub-populações são classicamente identificadas, as DC imaturas e maduras; a primeira delas compreende células eficientes na fagocitose de imunógenos, e estão localizadas na região do domo sub-epitelial das placas de Peyer. Após o contato com os antígenos, as DC migram para a região inter-folicular das placas de Peyer, tornando-se maduras e capazes de ativar linfócitos T. A migração dessas células é mediada por quimiocinas, em especial a CCR7, expressas na zona de linfócitos T. Na ausência de infecção, as DC produzem citocinas como IL-10 e TGF-β, mantendo o perfil de resposta do tipo Th3 e a supressão de resposta Th2.

Durante processo infeccioso, especialmente devido à expressão de antígenos protéicos, o microambiente das mucosas tende a induzir resposta Th2 devido à produção predominante de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 (KELSALL; JOHANSSON, 2005).

A diferenciação de linfócitos Th em subpopulações distintas de células efetoras depende dos estímulos presentes no início da resposta imune, como a presença de citocinas, a natureza do antígeno, a via de infecção, ativação ou não de células da imunidade inata e o uso de imunoestimuladores ou adjuvantes. No que se refere à imunização, a procura por um adjuvante que não interfira na polarização da

resposta imunológica é de grande interesse (BREWER, 2006); os resultados obtidos ao longo dos estudos sobre o efeito adjuvante da SBA-15 comprovam o alto potencial de aplicação dessa micropartícula em processos de vacinação, especialmente pela via oral.

Ainda, partículas com tamanhos entre 2-5 µm são facilmente capturadas pelas células M das placas de Peyer, enquanto as menores do que 2 µm e superiores a 10 µm são rapidamente drenadas para os linfonodos mesentéricos (SMITH, 1998). Devido ao tamanho das partículas micronizadas de SBA-15 apresentarem cerca de 30 µm, sugere-se que essas não sejam capturadas pelas placas e não interfiram diretamente na sua morfologia servindo apenas de veículo carreador de antígenos (CARVALHO, 2007).

As placas de Peyer, ao contrário dos linfonodos, possuem população de linfócitos B aproximadamente 5 vezes maior comparativamente a população de linfócitos T (CERUTTI, 2008).

Os resultados obtidos corroboram com os achados da literatura que mostram que as placas de Peyer contêm poucas APC e muitos linfócitos B e T, especialmente de memória. Ainda, contêm diferentes subpopulações de células dendríticas, com funções específicas dependendo do grau de ativação. Todas essas subpopulações apresentam como marcador de superfície o $CD11c^{HIGH}$ e níveis semelhantes de MHC classe II e moléculas estimuladoras (BRANDTZAEG et al., 1999).

Nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos, o marcador de mem brana $CD11b^{+}$ encontrados em macrófagos e em subpopulações de DC, cuja função é capturar e apresentar antígenos. Estas células são produtoras de IL-10 e induzem a produção de IL-4 e IL-10 por linfócitos T $CD4^{+}$ além de estimular células endoteliais a produzir TGF-β, gerando a resposta do tipo Th3 típica de mucosas e supressão da resposta Th1, tipicamente desencadeada por microorganismos como *S. typhimurium e T. gondii*. Células dendríticas das mucosas têm propensão a induzir resposta do tipo Th2 após infecção, principalmente, contra antígenos protéicos devido ao microambiente rico em IL-4, IL-5 e IL-10 e supressão da resposta Th1 (IWASAKI; KELSSALL, 2008; KELSALL; JOHANSSON, 2005).

Como as placas de Peyer, os linfonodos mesentéricos são importantes sítios de produção de IgA protetora (CERUTTI, 2008).

2JUSTIFICATIVA

As diarreias ainda são um importante problema da saúde pública no Brasil e em outros países em desenvolvimento. A cada ano são registrados cerca de dois milhões de óbitos no mundo, sendo a causa mais importante de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças de baixo nível sócio-econômico (BLACK et al., 2010). EPEC é uma das principais causas da diarreia na maioria dos países e, a infecção se dá por via oral. Presume-se que o sistema imune de mucosas seja o compartimento de maior importância na proteção do hospedeiro.

Entre os métodos de prevenção de doenças infecciosas destacam-se as vacinas. Doenças de grande importância em saúde pública como varíola, febre tifóide, paralisia infantil, sarampo, tétano, coqueluche, estão sob controle, algumas como as três primeiras, inclusive consideradas extintas pela OMS.

Com os custos crescentes nos serviços de saúde pública o aumento da vacinação, quando disponível, pode representar a melhor opção em termos de custo-benefício no controle dessas doenças. O sucesso espetacular de vacinas contra doenças como varíola e difteria mostram a importância desde método de profilaxia (WOODROW, 1997). Embora dois milhões de crianças sejam salvas a cada ano por imunização, têm sido difícil estender esta proteção a mais crianças nos países em desenvolvimento com a tecnologia existente (BLOOM, 1991). Uma boa estratégia seria o desenvolvimento de vacinas recombinantes, em geral, com veículos vivos de apresentação de antígenos, como por exemplo BCG e *M. smegmatis*, uma vez que a expressão contínua desses imunógenos poderia eliminar a necessidade de várias doses para se alcançar uma proteção máxima (ULMER et al., 1996).

Diarreia causada por EPEC é mais comum e mais grave na primeira infância, progressivamente menos frequente e mais branda na segunda e terceira infâncias e rara em adultos (LEVINE et al., 1985). Já o aparecimento de anticorpos circulantes segue curso inverso. Admite-se, portanto, que a exposição a EPEC durante a infância, induza imunidade natural contra este patógeno. Esses dados sugerem que o desenvolvimento de vacinas recombinantes, onde BCG e *M. smegamatis*expressem os principais fatores de virulência de EPEC, BfpA e Intimina, seria de grande utilidade em países como o Brasil que, de maneira perversa, associam-se subnutrição, condições precárias de habitação, falta de água potável e de rede de esgotos (SILVA; SILVA, 2005).

3OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho foi realizado com o objetivo desenvolver uma vacina recombinante BCG e/ou *Mycobacterium smegmatis*, que fosse capaz de induzir uma resposta imune específica e eficaz para epítopos presentes em proteínas importantes, BfpA e Intimina, de EPEC.

3.2 Objetivos Específicos

1- Purificar as proteínas BfpA e Intimina de EPEC;

2- produzir anticorpos em camundongos anti-BfpA e anti-Intimina;

3- clonar os genes *bfp*A e *intimina* de EPEC no plasmídeo de expressão pMIP12;

4- transformar cepas de BCG e *Mycobacterium smegmatis* com esses plasmídeos contendo os genes e selecionar as cepas que contenham o vetor de expressão com um dos genes (*bfp*A ou *intimina)*;

5- verificar se as cepas selecionadas de rBCG e rSmeg expressam *in vitro* as proteínas recombinantes BfpA e Intimina e *in vivo* são imunogênicas;

6- analisar a produção de anticorpos específicos anti-BfpA e anti-Intimina;

7- analisar a resposta imunológica.

4MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/C e C57Bl/6 fêmeas com cerca de quatro semanas de vida, pesando entre 18 e 22g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Camundongos do ICB-USP. Todos os animais foram mantidos em ambiente com renovação de ar, alimentação e água *ad libitum*, obedecendo às normas éticas para uso de animais de experimentação. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética sobre o uso de animais em experimentação- Instituto Butantan.

4.2 Bactérias e condições de cultura

Para a purificação das proteínas de interesse BfpA e Intimina, foram usadas *Escherichia coli* BL21 contendo o plasmídeo pEU84-*bfp*A cultivado em meio LB contendo kanamicina (20µg/mL)e ampicilina (100µg/mL) e *Escherichia coli* BL21 contendo o plasmídeo pET-28a com o gene da porção conservada de intimina ($Int_{388-667}$)cultivado em LB contendo kanamicina (20µg/mL).

Todas as etapas de clonagem foram executadas em *E. coli* DH5α, sendo transformadas pelo método padrão de $CaCl_2$ e cultivadas em Luria-Bertani (LB) contendo, quando necessário, ampicilina 100μg/mL ou kanamicina 20 μg/mL. Foram usadas as subcepas *Mycobacterium smegmatis* mc155e *Mycobacterium bovis* BCG Moreau (BCG), ambas do acervo do Laboratório de BCG Recombinante, Dra. Luciana C.C. Leite, (Centro de Biotecnologia – Instituto Butantan – São Paulo – SP). Bactérias BCG foram cultivadas em meio líquido Middlebrook 7H9 (MB7H9) ou meio sólido Middlebrook 7H10 (MBH10) (Difco Laboratories, UK), suplementados, respectivamente, com ácido oléico-albumina-dextrose-catalase (OADC) 10% mais Tween-80 0,05% (MB7H9/OADC/Tw) ou MB7H10/OADC. *M. smegmatis* foi cultivado somente em MB7H9 ou MB7H10, sem a presença do suplemento. Kanamicina (20 μg/mL), quando necessário, foi adicionada ao meio de cultura conforme indicado.

4.3Purificação de BfpA Recombinante

Escherichia coli BL21 contendo o plasmídeo pEU84-*bfp*A, foi cultivado em um pré-inóculo de 10mL de meio LB contendo kanamicina (20µg/mL)e ampicilina

(100µg/mL) por 18h a 37°C. Após incubação, 1mL desse pré- inóculo foi adicionado a 200mL de meio LB com (20µg/mL) e ampicilina (100µg/mL) durante 3h a 37°C sob agitação de 300rpm até atingir a densidade óptica (DO_{600nm}) de aproximadamente 0,6. Uma alíquota foi retirada para controle de pré-indução. Ao pré-inóculo foi adicionado 0,5 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Sigma, UK) seguindo-se de incubação a 37ºC por 4 h sob agitação de 300 rpm.Uma alíquota foi retirada para controle da cultura induzida. A cultura foi então centrifugada a 4000 *x g* por 30 min a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 20mL de tampão de lise (8M de Uréia; 0,1M NaH_2PO_4; 0,01M Tris-HCl; pH 8,0) e a cultura foi submetida a 10 ciclos de sonificação de 30 seg cada um. Em seguida, o lisado foi centrifugado a 12.000rpm por 15 min a 4ºC. O sobrenadante foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poros de 0,45µm e adicionado à coluna de Níquel-Sepharose (GE Healthcare, UK), previamente equilibrada com tampão de lise pH 8,0. Colocou-se a amostra e a deixou incubando sob leve agitação por 1h a 4°C. Após incubação, centrifugou-se por 1min a 7.000rpm, retirou-se o sobrenadante. A coluna foi lavada com tampão de lise pH 5,9 para retirar as proteínas inespecíficas e por fim as amostras foram eluídas com o tampão de lise pH 4,5 para a obtenção da proteína purificada.

Amostras dos eluatos foram dialisadas contra tampão PBS, pH 7,4 e o conteúdo protéico foi dosado por absorbância 280nm no aparelho “Nanodrop 1000 Spectrophotometer” (Thermo scientific, USA) para ser analisado por eletroforese de gel de acrilamida 15% contando SDS.

4.4 Purificação de Intimina Recombinante

Amostras de *Escherichia coli* BL21 contendo o plasmídeo pET-28a foram usadas como fonte do clone de gene da porção conservada de *intimina* ($Int_{388-667}$) (BATCHELORet al., 1999). As amostras do clone foram cultivadas em um pré-inóculo de 3mL de caldo LB contendo kanamicina (20µg/mL) e incubado a 37ºC por 18h. Após incubação, 3 mL de pré-inóculos foram adicionados a 200mL de caldo LB contendo kanamicina (20 µg/mL) e a cultura incubada a 37ºC sob agitação de 300rpm até atingir a densidade óptica DO_{600nm} 0,8.Uma alíquota foi retirada para controle de pré-indução. Ao meio foi adicionado 1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Sigma, UK) o qual foi incubado a 37ºC por 3 h sob

agitação de 300 rpm, sendo retirada uma alíquota para controle da cultura induzida. A cultura foi então centrifugada a 3.200 x *g* por 15 min a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 30 mL de tampão de ligação (20 mM de Tris-HCl pH 7,4; 100 mM de NaCl; 5 mM de imidazol). As células bacterianas em suspensão foram sonicadas. Após a sonicação foi adicionado 1 mM de fluoreto de fenilmetilsufato (PMSF). O lisado foi centrifugado a 2.000 x *g* por 30 min a 4ºC (centrífuga 5804 R Eppendorf, Germany).

O sobrenadante foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poros de 0,45µm e adicionado à coluna de Níquel-Sepharose (GE Healthcare,UK), previamente lavada com água destilada estéril e equilibrada com tampão de ligação. Após a passagem da amostra, a resina foi lavada com tampão de ligação para retirar as proteínas inespecíficas.

A proteína recombinante contendo a cauda de histidina se liga por afinidade ao níquel da resina, enquanto as proteínas inespecíficas são lavadas pelo tampão de ligação. Após lavagem a amostra foi eluída com tampão de eluição (20mM de Tris-HCl pH 7,4; 100 mM de NaCl; 500 mM de imidazol) para a obtenção da proteína purificada. A amostra foi dialisada contra PBS pH 7,4 e concentrada com PEG6000. Após concentração o conteúdo protéico foi dosado por absorbância 280nm no aparelho “Nanodrop 1000 Spectrophotometer” (Thermo scientific, USA) e o perfil eletroforético analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS/PAGE) a 12%.

4.5 Produção de Anticorpos anti-BfpA e anti-Intimina

Para produção de anticorpos anti-BfpA e anti-Intimina grupos de quatro camundongos foram inoculados pela viaintramuscular como indicado em cada experimento, com 20 µg da proteína BfpA ou Intimina numa solução de PBS + adjuvante Tetra Max (Sigma, UK). Decorridas duas semanas foram realizadas duas imunizações de reforço a intervalos entre uma e outra de quinze dias, injetando-se os antígenos, as proteínas BfpA ou Intimina somente em PBS. Imediatamente antes da primeira imunização foram coletadas amostras de sangue como fontes de soros pré-imunes. Quinze dias após a última imunização procedeu-se a sangria definitiva dos camundongos imunizados, previamente anestesiados, através do plexo retro-orbital. As amostras de sangue coletadas dos camundongos do mesmo grupo foram

reunidas em uma mesma mistura e depois centrifugadas por 10 min a 4.000 g. O soro foi separado e estocado a -20°C até a utilização.

4.6 Plasmídeos

O plasmídeo pMIP12 de expressão multifuncional (*Shuttle vector*) foi utilizado para a clonagem dos genes *bfpA e intimina,* pois permite a expressão de genes heterólogos. Este plasmídeo expressa três genes essenciais para clonagens: a) o gene de resistência a kanamicina derivado de Tn903; b) o promotor pblaF*, gene derivado de *Mycobacterium fortuitum*, um codon ATG de iniciação que permite a clonagem em múltiplos sítios (MCS); e, c) um códon de parada que favorece a estabilidade dos mRNAs transcritos do promotor pBLAF*. Expressa também uma sequência de DNA Shine-Dalgarno micobacteriana forte que permite que o gene inserido tenha tenha alta expressão.Genes de parasitas, bactérias, vírus e células eucarióticas podem ser expressados com sucesso nesse vetor (LE DANTEC et al., 2001).

O plamídeo pGEM-T Easy (Promega, USA) foi utilizado para subclonagem do produto de PCR dos genes *bfp*A e *intimina*.

O plasmídeo pQE-*intimina* foi utilizado para a purificação da proteína Intimina, e o plasmídeo pEU84-*bfp*A foi utilizado para a purificação da proteína BfpA.

4.7PCR e sub-clonagem em pGEMT-Easy

Os genes *bfpA* e *intimina* foram amplificados pelo método de “Polymerase Chain Reaction” (PCR) a partir da cepa protótipo de EPEC típica E2348/69 utilizando os oligonucleotídeos iniciadores apresentados na Tabela 3.

Quadro 2- Oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR dos genes *bfp*A e *intimina* de *E. coli* Enteropatogênica. FP, oligonucleotídeo direto; RP, oligonucleotídeo reverso. Os sítios de restrições *Kpn*I e *BamH*I estão sublinhados.

	FP	RP
*bfp*A	5’TAGGGATCCCTGTCTTTGATT GAATCTGCAATGGTGCTT3’	5’TAGGGTACCTTACTTCATAA AATATGTAACTTTATTGGT3’

intimina	5'TAGGGATCCGGGATCGATTAC C3'	5'TAGGGTACCTTTATCAGCC TTAATCTCA3'

Foram realizados 35 ciclos de amplificação de 50 seg a 92°C, 60 s a 54 °C e 50 segundos a 72 °C. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 1,0 % e purificados através do GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, USA).

Os produtos da PCR, correspondentes aos genes *bfpA* e *intimina*, apresentaram os tamanhos preditos, aproximadamente 600pb e 840pb, respectivamente, sendo então purificados e sub-clonados no vetor pGEM-T easy (Promega, USA) seguindo as orientações do fabricante. A confirmação das clonagens neste vetor foi realizada por digestão com a enzima de restrição *Eco*RI para liberação do inserto.

4.8Clonagem dos genes *bfp*A e *intimina* no vetor de expressão em micobactéria pMIP12

Os fragmentos correspondentes aos genes *bfp*A e *intimina* e sub-clonados em pGEM-T Easy foram digeridos com as endonucleases *BamH*I e *Kpn*I,purificados usando o kit GFX (Amersham Biosciences, USA) e clonados no vetor de expressão em micobactérias pMIP12, previamente digerido com *BamH*I e *Kpn*I. As construções obtidas foram então denominadas pMH12-*bfp*A e pMH12-*intimina*. Os plasmídeos resultantes dessa clonagem foram usados para transformar *E. coli* DH5α. Mini-preparações plasmidiais a partir das colônias selecionadas foram validadas por análise de restrição com as enzimas *BamH*I/*Kpn*I e por sequênciamento usando o primer 5' TTC AAA CTA TCG CCG GCT GA 3'.

4.9 Transformação e seleção

Micobactérias BCG e *Smegmatis* competentes foram transformadas com os plasmídeos de expressão por eletroporação. Para eletroporação, uma alíquota estoque de 50μL de BCG ou *M. smegmatis* competentes foi misturada com 1,0 μg de DNA plasmidial em cuveta de eletroporação de 2 mm e esta submetida a pulsações de 2,5 kV, 25 μF e 1000 Ω, num eletroporador de pulsação (BioRad, UK).

Após eletroporação, o conteúdo das cuvetas foi recuperado em 2mL de meio MB7H9/OADC sem antibiótico e incubado a 37 ^{o}C por 20 h (BCG) e em 2mL de meio MB7H9 sem antibiótico e incubado a 37 ^{o}C 2h (Smeg) antes de ser semeado sobre MB7H10 contendo kanamicina (20 μg/mL). Colônias transformadas foram selecionadas e recuperadas depois de cinco dias de incubação para *M. Smegmatis*a 37°C e de 20-30 dias de incubação para BCG a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO_2.

Para extração de proteínas ou preparação de vacina, as colônias isoladas de BCG e *M. smegmatis* foram crescidas em garrafas de 200 mL contendo respectivamente 50 mL de meio MB7H9/OADC ou MB7H9 mais kanamicina 20 μg/mL e incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 até a saturação.

4.10 Extração de proteínas

Amostras de 5 mL de bactérias recombinantes ou de controles “vazios”, não recombinantes, foram destinadas à extração de proteínas. As culturas de bactérias foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10min, as bactérias lavadas (1x) com 5 mL de PBS, centrifugadas novamente e as bactérias re-suspensas em 500 μL de PBS estéril contendo inibidores de proteases como Ditiotreitol (DTT), Fenilmetilsulfonil (PMSF), Aproptin, Leupeptin e Pepstatin (0,5μLde cada). Em seguida, as bactérias foram congeladas a -20°C até a etapa de sonicação. Após sonicação, 18 ciclos com 10 seg cada, com intervalos de 10 seg, as amostras foram centrifugadas, os sólidos foram descartados e os sobrenadantes recuperados para quantificação de proteína por absorbância de 280nm no aparelho “Nanodrop 1000 Spectrophotometer” (Thermo scientific, USA). Os extratos protéicos foram então aplicados em SDS-PAGE (gel de poliacrilamida mais dodecil sulfato de sódio) 12% para identificar Intimina e 15% para identificar BfpA e depois eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose para realização das análises de *immunoblotting*.

4.11 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS/PAGE)

SDS/PAGE foi feito essencialmente como descrito por porLaemmli (1970). Os géis de SDS-PAGE foram feitos em sistema descontínuo (Bio Rad Mini Protean II, USA), constituído de gel separador com 12% ou 15% de acrilamida (1,5 mL de Tris-HCl 3M pH 8.8; 2,4 mL de Acrilamida/bisacrilamida 30%; 20µL de SDS a 10%; 45 µL de APS a 10%; 5 µL de TEMED; 2 mL de água destilada) e o gel de empilhamento com 4% de acrilamida (1,5mL de Tris-HCl pH 6.8; 400µL de Acrilamida/Bisacrilamida; 30µL SDS a 10%; 30µL de APS a 10%; 6µL de TEMED; 1,049mL de água destilada) em tampão de corrida Tris-Glicina (Tris-base 1,5%; Glicina 7,2%; SDS 0.5%: pH 8,3). A corrente elétrica utilizada foi de 80v até as amostras cruzarem o gel de empilhamento, em seguida, ajustada para 120v até o fim da corrida.Amostras de extratos de rSmeg ou rBCG ou Smeg vazio ou BCG vazio (30 µg/poço) foram aplicadas paralelamente.

4.12*Immunoblotting*

As amostras destinadas à identificação das proteínas recombinantes por *Immunoblotting* foram pré-analisadas em SDS-PAGE como no item anterior. Bandas de proteínas resultantes da eletroforese de amostras de 30µg de cada lisado de rSmeg ou rBCG ou Smeg vazia ou BCG vazia foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Bio Rad, USA) utilizando o sistema Bio Rad Mini Transblot II sob voltagem constante de 10v por um período de 2h em tampão fosfato (Na_2HPO_4 1,5%; NaH_2PO_4 1,2%). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S (Sigma, USA) (Ponseau S 1g; ác. acético 1mL; H_2O destilada 100mL), lavadas com água destilada e bloqueadas com 50mL de leite desnatado (leite Molico a 5% em PBS) *overnight* a 4ºC. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo de camundongo monoespecífico anti-BfpA ou anti-intimina, diluídos 1:1000 e incubadas por 2h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 5 vezes com PBST (NaCl 0,8%; Na_2HPO_4 1,15%; KCl 0,2%; KH_2PO_4 0,2%; 0,5% tween) por 5min cada lavagem. Em seguida, as membranas foram tratadas com anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Southern Biotecnologies, USA), diluído 1:1000 por 2h a temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas 5 vezes com PBST (NaCl 0,8%; Na_2HPO_4 1,15%; KCl 0,2%; KH_2PO_4 0,2%; 0,5% tween) por 5min. Após as lavagens, as bandas de proteínas identificáveis pelos anticorpos anti-BfpA ou anti-Intimina foram reveladas

com solução 3,3-Diaminobenzidina (DAB) (4,9mL H_20; 0,1mL Tris 2M pH 7,5; 0,3mL Imidazol; 5mg DAB, 0,05mL H_20_2), a reação foi interrompida com adição de água destilada, logo após a visualização das bandas ou foram revelados com "Revelador Immobilon^{TM} Western chemiluminescent HRP substrat" (Millipore, USA) utilizando o aparelho Fotodocumentador Image Quant LAS 4000 (GE, USA).

4.13 Preparação da vacina

Os 45mL restantes das culturas bacterianas crescidas como informado anteriormente, foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 min., o precipitado lavado (2x) com igual volume de água mili-Q estéril, centrifugado novamente e as bactérias re-suspensas em 1 mL de uma solução de glicerol a 10 % em água estéril. As amostras foram aliquotadas em 50µL e conservadas a – 80°C para então serem usadas como vacinas nos camundongos.

4.14 Determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC).

Antes de se injetar as vacinas nos camundongos, foi necessáriodeterminar o número de UFC que seria aplicado nos animais. Amostras das vacinas foram diluídas 10^5 e 10^6 vezes e plaqueadas em meio 7H10 mais kanamicina 20µg/mL. Depois de 5 dias para *M. Smegmatis* e de 21 dias para BCG, o número de colônias presentes nas placas foi contado, determinando-se então o volume de vacina necessário para se introduzir 10^8 UFC de rSmeg ou rBCG ou Smeg vazio ou BCG vazio em cada animal.

4.15 Sílica SBA-15 : Sílicas mesoporosas altamente ordenadas

As amostras de SBA–15 foram sintetizadas utilizando um copolímero tribloco, o poli-(óxido de etileno)–poli-(óxido de propileno)-poli-(óxido de etileno) (Pluronic P123, $EO_{20}PO_{70}EO_{20,}$ PM= 5800 – BASF, USA), o tetraetil-ortosilicato (TEOS) foi adquirido da Fluka/Sigma Chemical Co. (Milwaukee, USA). O ácido hidroclorídrico foi adquirido da Fisher Scientific Co. (Pittsburgh, USA). Todos os reagentes foram utilizados segundo protocolo de instrução. Amostras da SBA-15 foram gentilmente cedidas pelos Drs. Osvaldo Augusto Sant´Anna do Laboratório de Imunoquímica do

Instituto Butantan e Márcia Fantini do Instituto de Física da Universidade de São Paulo.

4.16 Esquema de imunização

Os camundongos C57Bl/6 foram divididos em grupos (n= 5/grupo)e grupos imunizados ou por via oral (v.o.) juntamente com a sílica SBA-15 **Tabela 4** ou por via intraperitoneal (i.p.) sem a sílica SBA-15 **Tabela 5** com 200µl de uma solução salina estéril contendo $1x10^8$ UFC/camundongo de rSmeg ou Smeg ou BCG ou rBCG ou PBS, de acordo com o protocolo vacinal da **Tabela 6**. Os grupos de camundongos imunizados v.o. foram divididos da seguinte maneira: grupo 1 (PBS + SBA-15), usado como controle, , grupo 2 (vacina Smeg + SBA-15 - v.o.), grupo 3 (vacina rSmeg-Intimina + SBA-15 - v.o.), grupo 4 (vacina rSmeg-BfpA + SBA-15 - v.o.), grupo 5 (vacina BCG + SBA-15 - v.o.), grupo 6 (vacina rBCG-Intimina +SBA-15 – v.o) e grupo 7 (vacina rBCG-bfpA + SBA-15 - v.o.). Os grupos de camundongos imunizados via intraperitoneal foram divididos da seguinte maneira: grupo 1(PBS), grupo 2(Smeg vazio), grupo 3(rSmeg-BfpA), grupo 4 (BCG vazio) e grupo 5(rBCG-BfpA).

Quadro 3- Divisão dos grupos de camundongos para imunização Via Oral.

Grupo Via Oral	Animais	Vacina + SBA-15
1	5 camundongos	PBS (controle negativo)
2	5 camundongos	Smeg
3	5 camundongos	rSmeg-Intimina
4	5 camundongos	rSmeg-BfpA
5	5 camundongos	BCG
6	5 camundongos	rBCG- Intimina
7	5 camundongos	rBCG- BfpA

Quadro 4- Divisão dos grupos de camundongos para imunização Via Intraperitoneal.

Grupo	Animais	Vacina
Via Intraperitoneal		
1	5 camundongos	PBS (controle negativo)
2	5 camundongos	Smeg
3	5 camundongos	rSmeg-BfpA
4	5 camundongos	BCG
5	5 camundongos	rBCG- BfpA

Quadro 5- Esquema de Imunização de camundongos para verificar a produção de anticorpos anti-BfpA ou anti-Intimina.

Dia (s)	Dose / Camundongo
0	10^8 bactérias
15	10^8 bactérias
30	10^8 bactérias
45	10^8 bactérias

4.17 Imunização via oral (VO)

Para avaliação da resposta imunológica das vacinas recombinantes, camundongos C57Bl/6(n = 5/grupo) foram imunizados por gavagem com rSmeg ou rBCG ou Smeg ou BCG encapsulada ou não em SBA-15 (12 µg/animal) ou PBS +SBA-15 (grupo controle), num volume final de 0,2 mL. A vacina rSmeg ou rBCG na concentração final desejada de 10^8 bactérias foi diluída em tampão PBS. Para a adsorção a sílica, a vacina foi misturada a SBA-15 (12 µg de SBA-15/animal) na proporção 1:25 de antígeno:SBA-15 (v/v) por 24h a 4°C.

4.18 Imunização via intraperitoneal (IP)

Para comparar as vias de administração, as vacinas recombinantes foram administradas também intraperitonealmente. Camundongos C57Bl/6(n = 5/grupo) foram imunizados via intraperitonel com rSmeg ou rBCG ou Smeg ou BCG ou PBS,

num volume final de 0,2 mL. A vacina rSmeg ou rBCG ou Smeg vazio ou BCG vazio na concentração final desejada de 10^8 bactérias foi diluída em tampão PBS.

4.19 Coleta de Sangue

Amostras de sangue foram colhidas por capilaridade do plexo retro-orbital do olho direito antes da primeira imunização (dia 0) e 15 dias depois da última imunização (dia 60). As amostras de sangue coletadas dos camundongos do mesmo grupo foram reunidas em uma mesma mistura e depois centrifugadas por 10 min a 3.200 g. Os soros foram separados, aliquotados e armazenados a -20°C.

4.20 Coleta de Fezes

Para coleta das fezes pré-imunização e pós- imunização, os animais dos diferentes grupos experimentais foram colocados em gaiolas sem maravalha por 30 min. Os pellets fecais foram ressuspendidos em PBS contendo 1 mM PMSF e 1% de BSA na proporção de um grama de fezes para 5 mL da solução. Após repouso de 15 min em gelo, foram agitados vigorosamente em agitador *vórtex* e depois de mais 15 min em repouso, as amostras foram novamente agitadas e centrifugadas a 22.000 x *g* durante 10 min. Os sobrenadantes foram removidos, distribuídos em alíquotas e estocados a -80 °C para posterior análise de produção de anticorpos por ELISA e Ensaio de inibição de adesão entre EPEC e Hep-2.

4.21 Obtenção de Células do Baço

O baço dos camundongos C57Bl/6 imunizados foi retirado. Os órgãos foram coletados e mantidos em meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Brasil). Em seguida, foram macerados para obtenção das células. As suspensões celulares foram recuperadas, colocadas em tubos Falcon de 15 mL contendo meio completo e centrifugadas a *1500 x g* por 10min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido ressuspenso em 2mL de água destilada para lise das hemácias. Nesse caso, após 10 segundos, acrescentou-se PBS estéril e procedeu-se mais uma centrifugação, nas mesmas condições. O pellet foi novamente ressuspenso com 2mL de meio completo. As

células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada com Azul de Trypan. As amostras foram mantidas a 4 ºC durante todo o procedimento.

4.22 ELISA

As análises de indução de anticorpos específicos contra BfpA ou Intimina nos soros dos animais imunizados foram feitas pelo método de ELISA. Numa placa de 96 poços (Nalgene Nunc International, USA) foi adsorvida a proteína, BfpA (5μg/mL) ou Intimina (5μg/mL) ou extrato de Smeg (5μg/mL) ou extrato de BCG (5μg/mL) diluídas em 50 μL de tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 e incubada a 4°C por toda noite. Após a adsorção do antígeno, as placas foram lavadas duas vezes com PBST e bloqueados com leite em pó 5% (200μL/poço) diluída em PBS por uma hora, a temperatura ambiente. Após o bloqueio e três novas lavagens com PBST, foram acrescentados os soros e extratos de fezes (50μL/poço) diluídos em PBST, começando com uma diluição inicial de 1:2 seguindo de diluições (fator 5) até o limite de 1:250. Como controle positivo, foi utilizado IgG de camundongos imunizados com as proteínas purificadas BfpA ou Intimina. A incubação da placa foi feita a 37ºC por 1h no caso da detecção de IgG ou por 18 h no caso da detecção de IgA sérica e s-IgA. Após três lavagens com PBST, foram adicionados os anticorpos de camundongo conjugados anti-IgG diluído 1:2000 (50μL/poço) (Southern Biotechnologies, USA) e anti-IgA diluído 1:500 (50μL/poço) (Sigma, USA) marcados com peroxidase em PBST e nova incubação foi realizada a 37ºC por 1h. Esta reação foi revelada pela adição do substrato H_2O_2 e ortofenildiamina – OPD (Sigma, USA) diluídos em tampão (5,75mL H_20 dest.; 3,25mL ácido cítrico 0,1M; 3,5mL fosfato de sódio 0,2M; 5mg OPD; 0,005 H_20_2). A reação foi interrompida adicionando-se H_2SO_4 3N (50μL/poço) e lida em comprimento de onda de 450nm ou 492nm em espectrofotômetro de placas (Tittertek Multiskan, USA).

4.23 Detecção de anticorpos Anti-BfpA por *Immunoblotting*

Amostras das proteínas BfpA ou Intimina purificadas foram submetidas a SDS-PAGE com gel contendo, respectivamente, 12% ou 15% de acrilamida. A cada canaleta foram aplicados 30 μg da proteína BfpA ou Intimina purificadas. Ao término

da corrida, o gel foi submetido à etapa de eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose de 0,45µm (Bio Rad, USA), como descrito acima.

4.24 Detecção de Citocinas em Sobrenadantes de Cultura de Células

Células do baço obtidas como descrito anteriormente, foram plaqueadas com meio RPMI + 5% SFB + mix de antibióticos e polimixina (Sigma, USA), num volume final de 1mL. As células foram estimuladas com extrato de Smeg ou BCG, proteínas purificadas BfpA ou Intimina e concanavalina A (ConA), ou não foram estimuladas. As placas foram incubadas durante 48 h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO_2. Após incubação o sobrenadante foi retirado e analisado pelo "kit" CBA Th1/Th2 (Cytometric Bead Array – BD Bioscience, USA) no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, USA).

4.25 Análise por Citometria de fluxo

Células do baço de animais imunizados foram caracterizadas por citometria de fluxo quanto às moléculas expressas em sua superfície. Em placas de 96 poços (**Corning**-**Costar** Corp., **Cambridge, MA**, EUA), 100 µL da suspensão celular (2-5 x 10^5 células/mL) foram adicionados por poço e as placas centrifugadas a 300 x g por 8 minutos a 4 ºC. Anticorpos monoclonais conjugados (BD Bioscience, San Jose, CA, E**UA**) com fluorocromo fluoresceína(FITC)ou ficoeritrina(PE)anti-CD4(Clone RM4-5; FITC), anti-CD8α (Clone 53-6.7;PE), anti-CD45R/B220 (Clone RA3-6B2; FITC) e anti-CD3, foram adicionados (1 µL/poço); as placas foram incubadas no escuro por 30 min. a 4 ºC. Passado o período de incubação, procedeu-se à lavagem por duas vezes com tampão FACS e centrifugadas novamente. As células foram ressuspendidas em 250 µL de tampão FACS acrescido de 1% paraformaldeído para aquisição no citômetro de fluxo (FacScalibur – BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). A operação do citômetro e a análise dos resultados foram realizadas em colaboração com a Dra. Dunia Rodriguez e da aluna de doutorado Cibelly Goulart, ambasdo Laboratório de Biotecnologia IV do Instituto Butantan.

4.26 Ensaio de Inibição de Aderência de EPEC em Hep-2

Células Hep-2 foram cultivadas em meio DMEM +10% SFB em placas de 24 poços com uma lamínula em cada poço, no volume final de 1mL por poço. As placas foram incubadas durante 48 h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO_2, para obter uma confluência de 80%.

Numa placa em separado foram incubados 10 µL de cultura de bactéria E2348/69 crescida "overnight" em meio LB com 125 µL de soro ou suspensão de fezes (anticorpos) em meio DMEM + 2% SFB + 1% D-manose, ou somente bactéria com meio durante 1 h a 37 °C. Essa suspensão foi adicionada a placa de células (500 µL/poço) e incubadas durante 3 h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO_2. A placa foi lavada 3x com PBS e fixada com metanol 70%. Após fixação as lamínulas foram coradas com corante May-Grunwald por 5 min/Giemsa por 20 min, e fotodocumentadas no microscópio óptico em aumento de 1000x.

4.27 Análises estatísticas

O teste *t-Student* foi utilizado para as análises estatísticas entre os diferentes grupos de camundongos e um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significante.

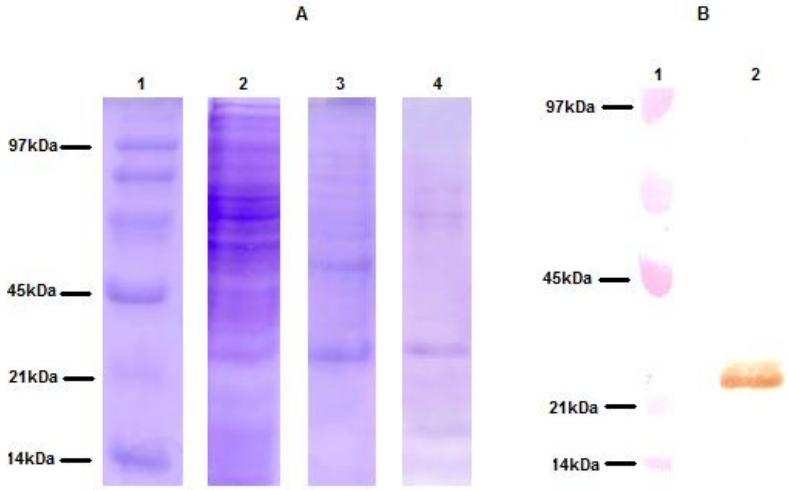
5RESULTADOS

5.1 Purificação e expressão das proteínas BfpA e Intimina recombinantes

As proteínas recombinantes BfpA e Intimina foram expressas após a indução dos respectivos promotores dos plasmídeos pEU84 e pQE30, pela adição de IPTG ao meio de cultura contendo as amostras bacterianas recombinantes em fase log de crescimento. Antes da adição de IPTG, e ao final do período de indução, foram retiradas alíquotas da cultura como controle negativo e confirmação da expressão das proteínas por SDS-PAGE. Conforme se observa nas **Figuras 2 e 3 (A)**, as proteínas são expressadas em baixo nível antes da adição do IPTG **(poços 2)**, porém, após três horas de indução, observa-se uma maior expressão das proteínas **(poços 3)**. Após purificação em coluna de níquel se obteve a proteína purificada, como pode ser observada através das bandas referentes às proteínas de massas moleculares esperadas: BfpA, aproximadamente 21 kDa e Intimina, aproximadamente 34 kD **(poços 4)**. A concentração final das proteínas recombinantes BfpA e Intimina, medidas pela absorbância em 280 nm no aparelho "Nanodrop 1000 Spectrophotometer" (Thermo scientific, USA) foi de 378 µg/mL e 431 µg/mL, respectivamente.

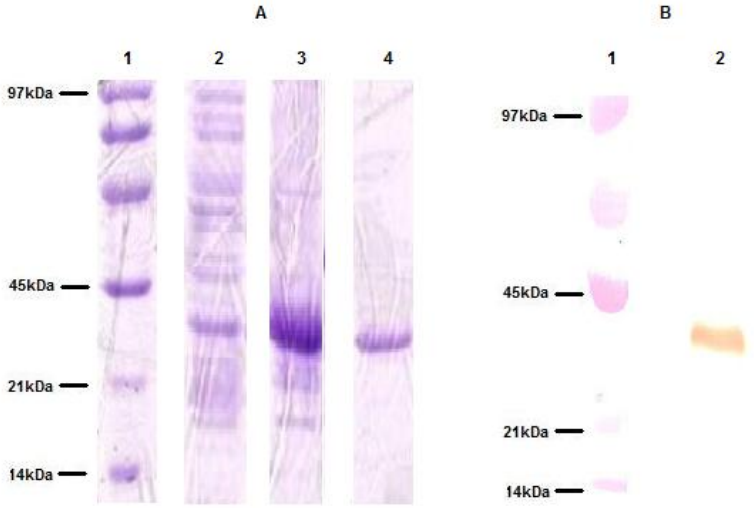
Com o objetivo de averiguar se as proteínas purificadas eram mesmo as proteínas esperadas, foi realizado um *immunoblotting* utilizando soro dos animais imunizados com 20 µg das proteínas purificadas. As **Figuras 2 e 3 (B, poços 2)** apresentam as membranas de nitrocelulose desses *Immunoblottings*. Pode-se observar que o soro dos animais reconheceu somente as bandas das proteínas recombinantes, o que significa que estas proteínas são capazes de induzir a produção de anticorpos monoespecíficos.

Figura 2- Purificação da proteína BfpA em coluna de níquel.



SDS-PAGE 15% e *Immunoblotting*. A1- PM, A2- Sobrenadante do cultivo de *E. coli* não induzido, A3- Sobrenadante do cultivo de *E. coli* induzido, A4- resultado da cromatografia de coluna de níquel com amostra contendo a proteína BfpA. B1- PM, B2- BfpA purificado reconhecido pelos anticorpos do soro dos camundongos imunizados com a proteína recombinante.

Figura 3- Purificação da proteína Intimina em coluna de níquel.



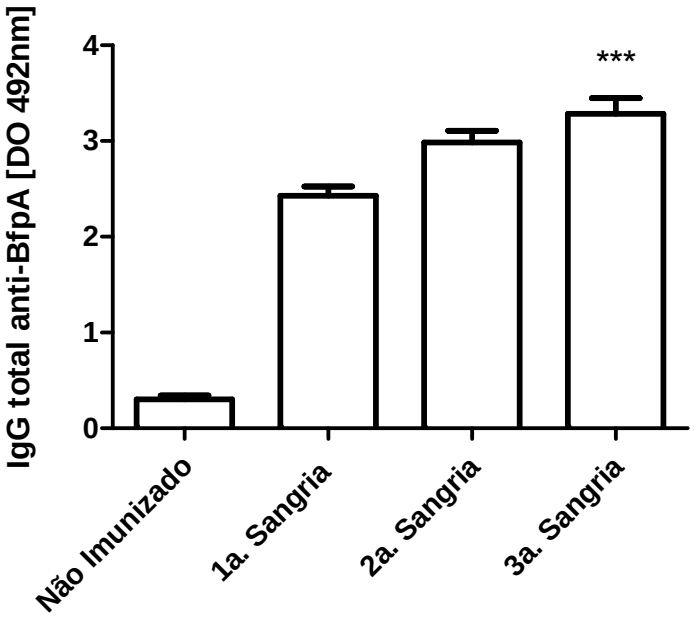
SDS-PAGE 12% e *Immunoblotting***.** A1- PM, A2- Sobrenadante do cultivo de *E. coli* não induzido, A3- Sobrenadante do cultivo de *E. coli* induzido, A4- resultado da cromatografia de coluna de níquel com amostra contendo a proteína Intimina. B1- PM, B2- Intimina purificada reconhecido pelos anticorpos do soro dos camundongos imunizados com a proteína recombinante.

5.2 Avaliação da produção de Anticorpos IgG Total produzido em camundongos

Soro dos camundongos fêmeas BALB/C imunizados com três doses de 20 µg das proteínas BfpA ou Intimina purificadas, foram titulados por ELISA. Como pode

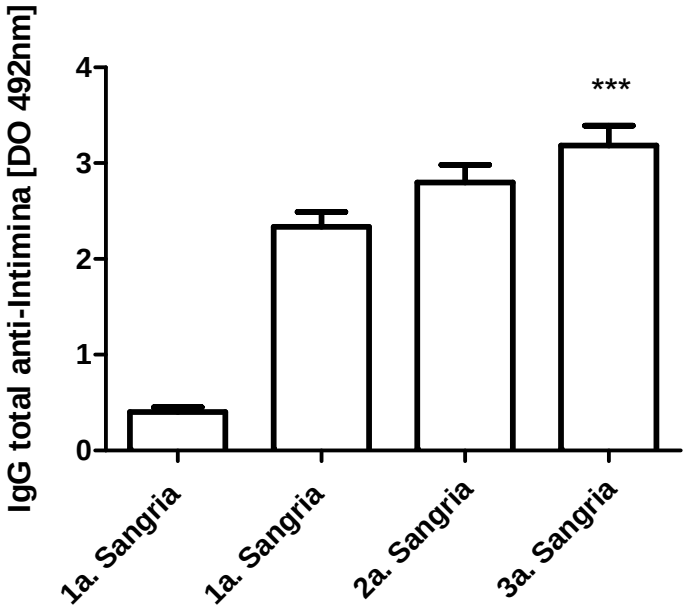
ser visto nas **Figura 4** (BfpA) **e 5** (Intimina), os grupos de animais imunizados, apresentaram resposta imune vigorosa com produção de anticorpos IgG, cujos títulos aumentaram durante a imunização, chegando ao título final de 1:20.000 para BfpA e 1:15.000 para Intimina, após a terceira imunização. Os grupos de camundongos foram sangrados também no dia 0, como controle negativo, e, realmente, não se detectou anticorpos específicos anti-BfpA ou anti-Intimina nesses animais. Esses resultados revelam que as proteínas recombinantes escolhidas para este trabalho são altamente imunogênicas.

Figura 4- Títulos de anticorpos IgG Total anti-BfpA produzidos por camundongos BALB/C imunizados pela via intramuscular.



Títulos de IgGTotalapós imunização com BfpA purificada. Dosagem realizada pelo método de ELISA no dia 0 e no dia 45 da resposta primária. Resultados de três experimentos independentes expressos em média ± SD; n = 4 animais/grupo;grupo de animais imunizados com BfpA foi utilizado como referência para análise do teste *t* de Student, $^{***}p < 0{,}001$.

Figura 5- Títulos de anticorpos IgG total anti-Intimina produzidos por camundongos BALB/C imunizados pela viaintramuscular.



Títulos de IgGtotalapós imunização com Intimina purificada. Dosagem realizada pelo método de ELISA no dia 0 e no dia 45 da resposta primária. Resultados de três experimentos independentes expressos em média ± SD; n = 4 animais/grupo; grupo de animais imunizados com Intimina foi utilizado como referência para análise do teste *t* de Student, $^{***}p < 0{,}001$.

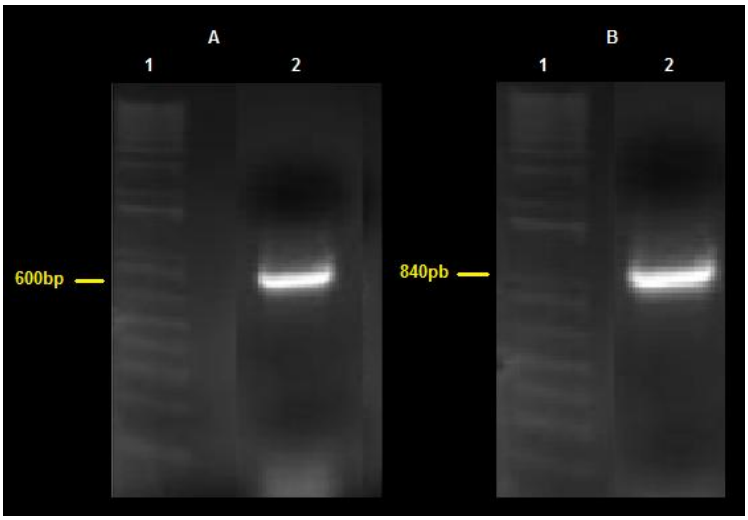
5.3 Clonagem das sequências codificadoras para BfpA e Intimina de EPEC no plasmídeo pMIP12

Para a construção do vetor de expressão de BfpA e Intimina em BCG e *M. smegmatis*, os genes *bfp*A e *intimina* foram amplificados por PCR, a partir da cepa protótipo de EPEC E2348/69utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos contendo as sequências de restrição das enzimas *BamH*I e *Kpn*I de acordo com a Tabela 3. Um amplicon de aproximadamente 600pb foi gerado como produto do PCR para o gene *bfp*A e de 840pb para o gene *intimina*, e purificados a partir de um gel preparativo de agarose 1% usando o Kit-GFX^{TM} PCR and Gel Band Purification Kit e clonado no vetor pGEMT-Easy, gerando os plasmídeospGemT-*bfp*A e pGemT-*intimina*endonucleases de restrição *BamH*I e *Kpn*I para liberação do inserto correspondente, respectivamente, aos genes *bfp*A **(Figura 6A)** e *intimina***(Figura 6B)**. Os genes *bfp*A e/ou *intimina* foram então ligados ao vetor de expressão pMIP12 também digerido com as mesmas enzimas de restrição *BamH*I *e Kpn*I.O plasmídeo

pMIP12, gentilmente cedido pela Dra. Brigitte Gicquel do Instituto Pasteur **(Figura 7).** As construções obtidas foram denominadas pMH12-*bfp*A e pMH12-*intimina*.

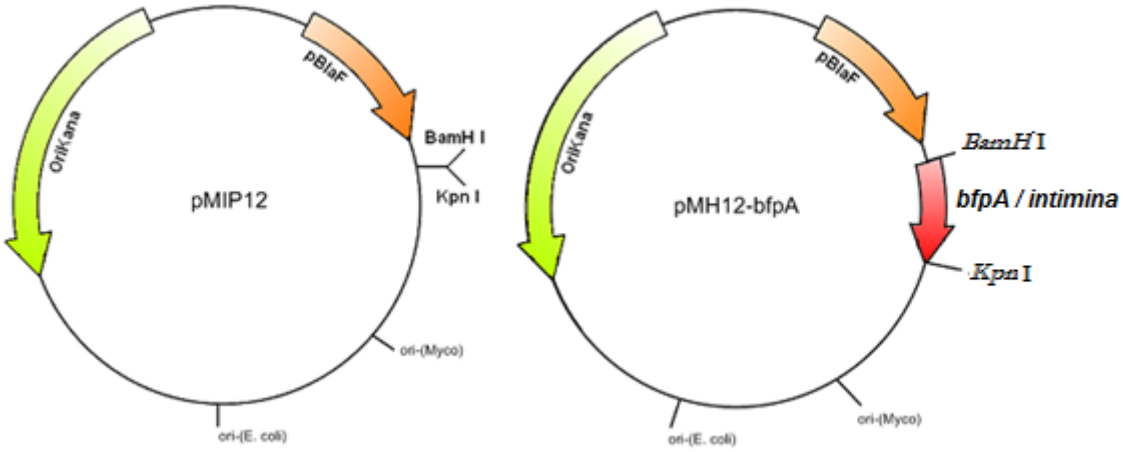
Células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5α foram transformadas com as ligações pMH12-*bfp*A ou pMH12-*intimina* e as transformantes selecionadas em meio sólido LB ágar contendo kanamicina (20µg/mL). Os clones foram validados por digestão e sequênciamento, utilizando as mesmas enzimas de restrição e iniciadores específicos para o sequênciamento do plasmídeo pMIP12.

Figura 6- Fragmentos dos genes *bfp*A e *intimina* amplificados por PCR.



A partir da cepa protótipo de EPEC E2348/69. Os genes *bfp*A e *intimina* foram amplificados com primers específicos de acordo com a Tabela 3 . A1- PM, A2- *bfp*A. B1- PM, B2- *intimina*.

Figura 7- Representação esquemática das clonagens dos genes *bfp*A e *intimina* no vector de expressão pMIP12.



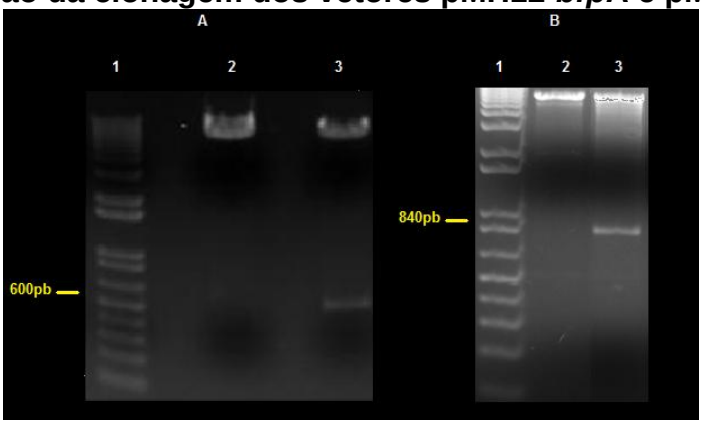
O vetor contém origens de replicação, ori-(E. coli) e ori-(Mycobatéria); o gene de resistência a kanamicina; o promotor mutado da β-lactamase de *Mycobacterium fortuitum* (pBlaF*); o códon de iniciação e sequência de Shine-Dalgarno micobacteriana.

5.4 Validação da clonagem dos vetores pMH12-*bfp*A e pMH12-*intimina*

Para corroborar e confirmar os resultados obtidos a partir da clonagem nos vetores pMH12-*bfp*A e pMH12-*intimina*, realizamos digestões com as endonucleases de restrição *Kpn*I e *BamH*I, como metodologia-base de validação**.** De acordo com o padrão obtido pela digestão dos plasmídeos com estas enzimas **Figura 8** da digestão dos plasmídeos, podemos observar que houve uma inserção correta dos genes *bfp*A (600 pb) **(Figura 8A, linha 3)** e do gene *intimina* (840 pb) **(Figura 8B, linha 3)**.

Para verificar se o gene foi clonado na posição fase de leitura correta e observar possíveis modificações nos genes *bfp*A e *intimina* foi utilizado o método de sequênciamento dos plasmideos pMH12-*bfp*A e pMH12-*intimina* utilizando um oligonucleotídeo inciador que se anela à aproximadamente 120 pares de bases anterior ao sítio de ligação do inserto**.** O sequênciamento dos insertos comprovou que se trata dos genes *bfp*A e *intimina*, através da análise no banco de dados com uso da "Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)" do sítio "Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI)" com um percentual de similaridade superior a 90%.

Figura 8- Validação da clonagem dos vetores pMH12-*bfp*A e pMH12-*intimina*.



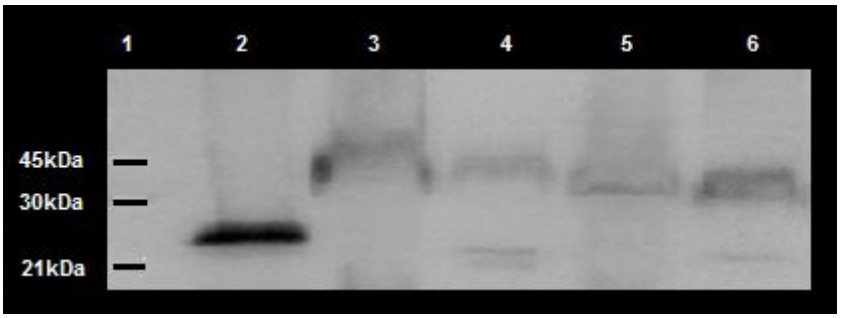
As construções foram confirmadas por análise de restrição com as enzimas *BamH*I e *Kpn*I. A1-PM, A2- pMIP12 vazio, A3- pMH12-*bfp*A. B1- PM, B2- pMIP12 vazio, B3- pMH12-*intimina*.

5.5 Expressão das proteínas BfpA e Intimina em *Mycobacterium smegmatis* recombinante (rSmeg) e BCG recombinante (rBCG)

Alíquotas de *Mycobacterium smegmatis* MC155 competentes foram transformadas com os vetores de expressão pMH12-*bfp*A ou pMH12-*intimina* gerando, respectivamente, rSmeg-*bfp*A e rSmeg-*intimina*. Os transformantes foram então selecionados em meio sólido MB7H10 contendo kanamicina e expandidos posteriormente em meio líquido MB7H9 mais kanamicina. Extratos totais dos diferentes clones de rSmeg foram submetidos a SDS-PAGE seguido de *Immunoblotting* usando anticorpo IgG mouse policlonal anti-BfpA ou anti-Intimina. Foi possível observar a expressão de uma proteína, de tamanho esperado, respectivamente, um pouco acima de 21kDa, no ensaio de *Immunoblotting* na construção rSmeg-BfpA (**Figura 9, linha 4**) e de aproximadamente 34kDa na construção rSmeg-Intimina (**Figura 10, linha 3**). O controle negativo, Smeg vazio, não apresentou banda nesta altura (**Figura 9, linha 3** e **Figura 10, linha 4**). Como controle positivo foi usada uma amostra de BfpA purificada ou Intimina purificadade EPEC onde se pode observar a banda correspondente às proteínas BfpA e Intimina (**Figura 9, linha 2**- BfpA e **Figura 10, linha 2**- Intimina).

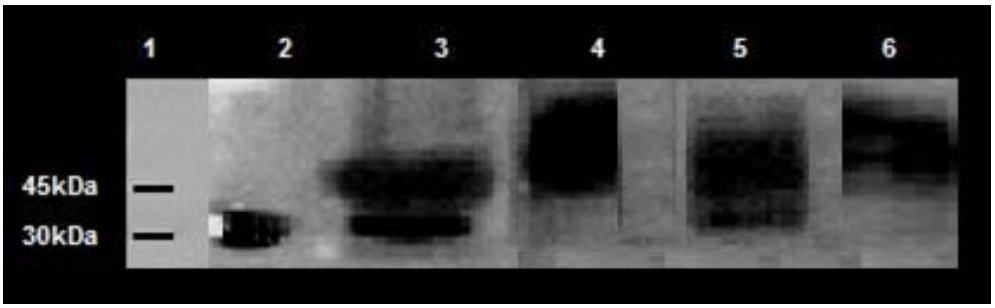
BCG competente foi transformado com pMH12-*bfp*A ou pMH12-*intimina* e os clones de rBCG transformados foram selecionados em meio sólido MB7H10/kanamicina e expandidos em meio líquido. Extratos protéicos de rBCG transformados com os respectivos vetores de expressão foram fracionados em SDS-PAGE 15% e submetidos à análise por *Immunoblotting* usando um anticorpo policlonal IgG mouse anti-BfpA ou anti-Intimina. Os clones de rBCG transformados com pMH12-*bfp*A (rBCG-BfpA) ou pMH12-*intimina* (rBCG- Intimina) apresentaram bandas imunoreativas nas alturas esperadas, correspondente a uma proteína de peso molecular um pouco acima de 21kDa (**Figura 9, linha 6**- BfpA) e 34kDa (**Figura 10, linha 5**- Intimina). O controle negativo, BCG vazio, não apresentou banda nesta altura (**Figura 9, linha 5** e **Figura 10, linha 6**). Como controle positivo foi usada uma amostra de BfpA purificada (**Figura 9, linha 2**) ou Intimina purificada (**Figura 10, linha 2**).

Figura 9- Expressão da proteína BfpA de EPEC em *Mycobacterium smegmatis* e BCG.



Extrato total de rSmeg-*bfp*A, rBCG-*bfp*A, Smeg vazio e BCG vazio (30 µg/poço) foram analisadas por *Western blot* usando um anticorpo IgG mouse anti-BfpA. 1-PM, 2- BfpA purificada, 3-Smeg vazio, 4- rSmeg- *bfp*A, 5- BCG vazio e 6- rBCG-*bfp*A.

Figura 10- Expressão da proteína Intimina de EPEC em *Mycobacterium smegmatis* e BCG.



Extrato total de rSmeg-*intimina*, rBCG-*intimina*, Smeg vazio e BCG vazio (30 µg/poço) foram analisadas por *Immunoblotting* usando um anticorpo IgG mouse anti-Intimina. 1-PM, 2- Intimina purificada, 3- rSmeg- *intimina*, 4- Smeg vazio, 5- rBCG-intimina e 6- BCG vazio.

5.6 Resposta imune humoral com produção de anticorpos IgA (séricos e secretados) contra as proteínas BfpA e Intimina em animais imunizados por via oral

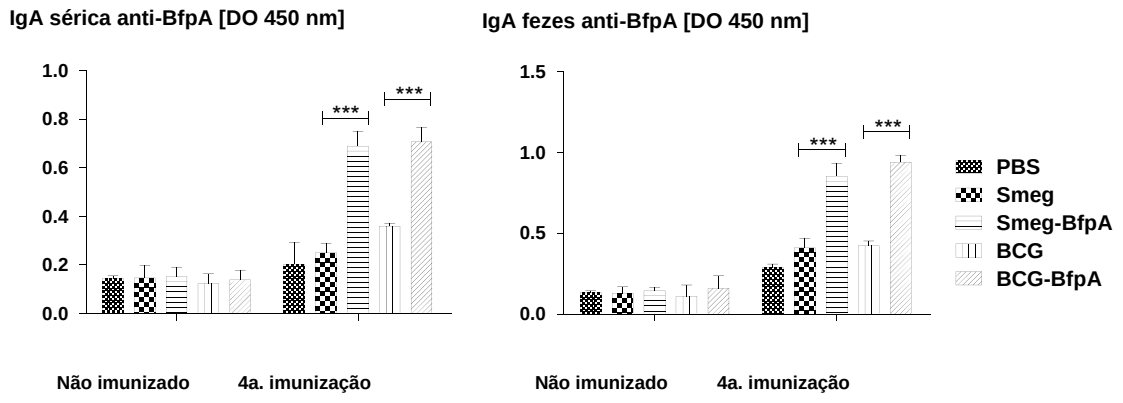
Investigamos a cinética da resposta de anticorpos IgA (anti-BfpA ou anti-Intimina) sérico e secretado na mucosa intestinal de camundongos C57Bl/6 submetidos ao regime vacinal padrão (Tabela 6). O soro e as fezes pertencentes aos animais dos grupos imunizados por via oral com as vacinas recombinantes, mais os grupos controles, foram coletados quinze dias após a última imunização e a resposta de anticorpos IgA por grupo (*pool*) avaliada contra as proteínas

recombinantes BfpA e Intimina pelo método de ELISA. Foi possível observar (Figuras 11A e 12A) que as vacinas recombinantes foram capazes de estimular a produção de anticorpos IgA sérico anti-BfpA e anti-Intimina de maneira específica e estatisticamente superior aos grupos controles (animais imunizados com PBS, Smeg vazio e BCG vazio).

A resposta de anticorpos especificos IgA anti-BfpA e anti-Intimina secretados na mucosa intestinal e presentes nas fezes também foi analisada. Os títulos de anticorpos obtidos nas fezes no 60º dia após a primeira imunização podem ser observados nas **Figuras 11B** (BfpA)e **12B** (Intimina). Semelhante ao encontrado para os níveis séricos de IgA, a imunização com as vacinas recombinantes por via oral também foi capaz de estimular uma boa produção de s-IgA anti-BfpA ou anti-Intimina depois da quarta imunização e estatisticamente siginificante comparativamente aos animais dos grupos controles (PBS, Smeg vazio e BCG vazio). Nenhum dos grupos de camundongos apresentou quantidade significativa de anticorpos específicos no soro ou nas fezes contra essas proteínas no dia zero ou antes do 60ºdas imunizações.

Figura 11- Detecção anticorpos IgA sérico e secretados anti-BfpA pré-imunização e pós-imunização via oral.

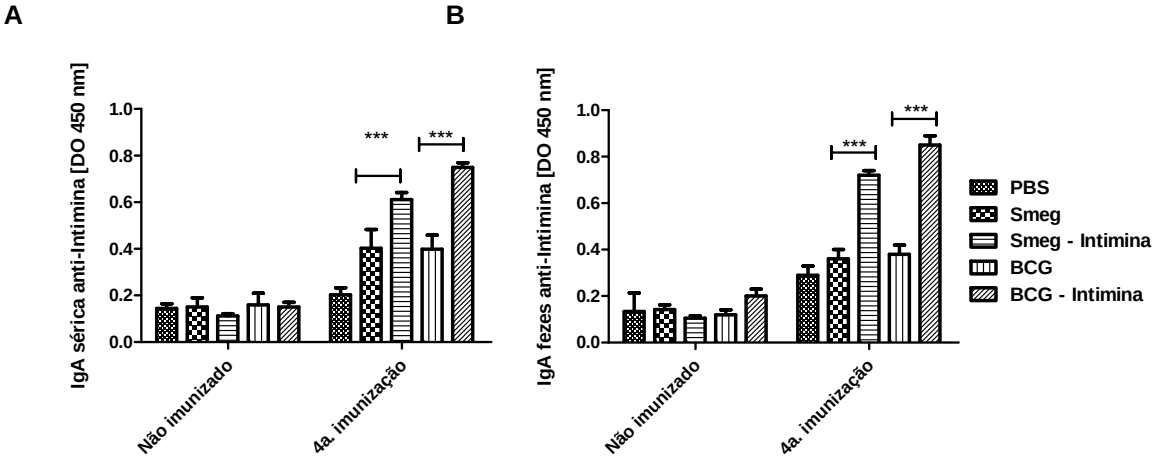
A **B**



Soro (A) e fezes (B) de camundongos imunizados com 10^8ufc/mL de rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA ou dos grupos controles (PBS, Smeg vazio e BCG vazio), seguindo o mesmo regime de imunização dos recombinantes, foram coletados antes das imunizações (dia 0) e após 4 imunizações (dia 60) e a resposta de anticorpos IgA específicos anti-Intimina analisada por ELISA. Os grupo de animais

imunizados somente com Smeg ou BCG foram utilizados como referência para análise do teste *t* de Student, $^{***}p < 0,001$.

Figura 12- Detecção anticorpos IgA sérico e secretado anti-Intimina pré-imunização e pós-imunização via oral.



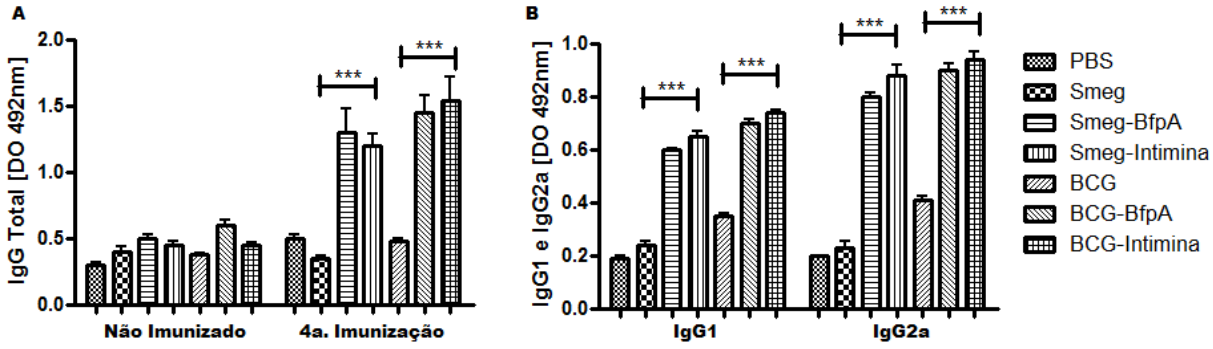
Soro (A) e fezes (B) de camundongos imunizados com 10^8 ufc/mL de rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina ou dos grupos controles (PBS, Smeg vazio e BCG vazio), seguindo o mesmo regime de imunização dos recombinantes, foram coletados antes das imunizações (dia 0) e após 4 imunizações (dia 60) e a resposta de anticorpos IgA específicos anti-Intimina analisada por ELISA. Os grupo de animais imunizados somente com Smeg ou BCG foram utilizados como referência para análise do teste *t* de Student, $^{***}p < 0,001$.

5.7 Resposta imune humoral com produção de anticorpos séricos IgG contra as proteínas BfpA e Intimina em animais imunizados por via intraperitoneal

A produção de anticorpos IgG Totais anti-BfpA e anti-Intimina seguindo o mesmo regime de imunização, porém mudando a via de imunização também foi avaliada. Grupos de 5camundongos foram imunizados intraperitonealmente com 10^8 ufc/mL de rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA ou rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina no mesmo regime vacinal de 4 doses com intervalos de 15 dias entre as doses, mas sem a presença da sílica SBA-15. Grupos de animais controles foram utilizados seguindo o mesmo protocolo de vacinação. Os animais imunizados com as vacinas recombinantes apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG totais anti-BfpA ou anti-Intimina quando comparados com os grupos controles PBS, Smeg vazio e BCG vazio. Esses mesmos grupos não apresentaram produção significante de anticorpos específicos anti-BfpA ou anti-Intimina na pré-imunização **(Figura 13A)**.

Foi avaliado também o perfil de subclasses de imunoglobulinas (IgG1 e IgG2a) nesses mesmos soros. Para caracterizar a tendência da resposta imunológica (Th1 ou Th2), a produção dos isótipos de IgGs (IgG1 e IgG2a) foi avaliada nos soros dos animais imunizados via intraperitoneal com 10^8UFC/mL de rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA ou rSmeg-Intimina ou rBCG-Intiminaou com os controles PBS, Smeg vazio e BCG vazio, todos sem a sílica SBA-15. Todas as vacinas recombinantes foram capazes de estimular especificamente contra as proteínas BfpA ou Intimina, o sistema imune humoral, quando comparadas com os controles. A subclasse IgG2a foi superior na resposta de anticorpos induzidos pelas vacinas recombinantes administradas quando comparadas com a subclasse IgG1, caracterizando assim uma resposta Th1 (**Figura 13B**).

Figura 13- Detecção de anticorpos IgG Total sérico e seus Isótipos IgG1 e IgG2a antígeno-específicos anti-BfpA ou anti-Intimina após 4ª imunização por via intraperitoneal.



Níveis séricos de anticorpos (**A**) IgG Total e (**B**) isótipos IgG1 e IgG2a anti-BfpA ou anti-Intimina foram determinados por ELISA na diluição 1:250 em soro de camundongos imunizados quatro vezes com as vacinas recombinantes rSmeg-BfpA ($1x10^8$ ufc/mL) ou rBCG-BfpA ($1x10^8$ ufc/mL) ou rSmeg-Intimina ($1x10^8$ ufc/mL) ou rBCG-Intimina ($1x10^8$ ufc/mL) via intraperitoneal sem SBA-15. Camundongos imunizados com PBS ou Smeg ou BCG, seguindo o mesmo regime de imunização dos recombinantes, foram usados como controles negativos. Comparou-se a relação IgG1 e IgG2a pelo teste *t*de Student***p< 0,001

.

5.8*Imunnoblotting* das proteínas recombinantes BfpA e Intimina usando os soros dos animais imunizados com as vacinas recombinantes

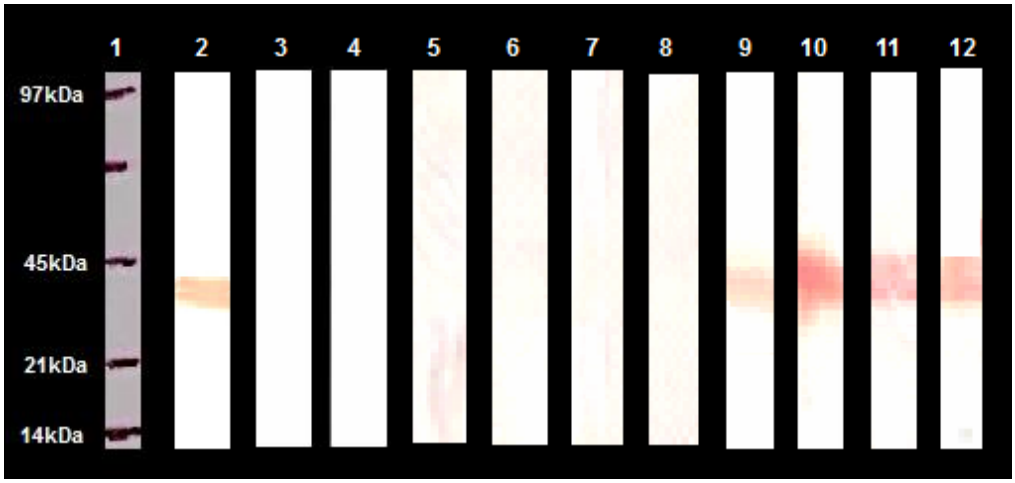
As amostras das proteínas recombinantes BfpA e Intimina purificadas foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE, eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas a reação individual com anticorpos IgA provenientes dos

soros e das fezes dos camundongos imunizados via oral ou com anticorpos IgG totais presentes no soro dos camundongos imunizados pela via intraperitoneal. Pode-se observar nas **Figuras 14** e **15** que os anticorpos séricos e secretados IgA obtidos dos animais imunizados com as vacinas recombinantes (rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA e rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina, respectiavamente) foram capazes de reconhecer as proteínas BfpA e Intimina de forma específica (**linhas 9 e 11 IgA sérico; linhas 10 e 12 IgA secretado**). Não foi observada nenhuma banda referente às proteínas recombinantes utilizando os soros dos animais dos grupos controles. Os controles positivos (IgG anti-BfpA ou anti-Intimina) foram capazes de reconhecer as proteínas recombinantes purificadas BfpA e Intimina (**linha 2**).

Figura 14- Detecção de anticorpos IgA sérico e secretados anti-BfpA de camundongos imunizados via oral com as vacinas rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA.

Grupos de 5 camundongos C57Bl/6 fêmea foram imunizados de acordo com o regime padrão de imunização e os soros e as fezes de cada grupo coletados 15 dias após a última imunização para analise de anticorpos anti-BfpA por *Immunoblotting*. 1- PM, 2- BfpA purificada (25 µg/mL) (controle positivo), 3- soro do grupo PBS, 4- fezes do grupo PBS, 5- soro do grupo Smeg vazio, 6- fezes do grupo Smeg vazio, 7- soro do grupo BCG vazio, 8- fezes do grupo BCG vazio, 9- soro do grupo rSmeg-BfpA, 10- fezes do grupo rSmeg-BfpA, 11- soro do grupo rBCG-BfpA e 12- fezes do grupo rBCG-BfpA.

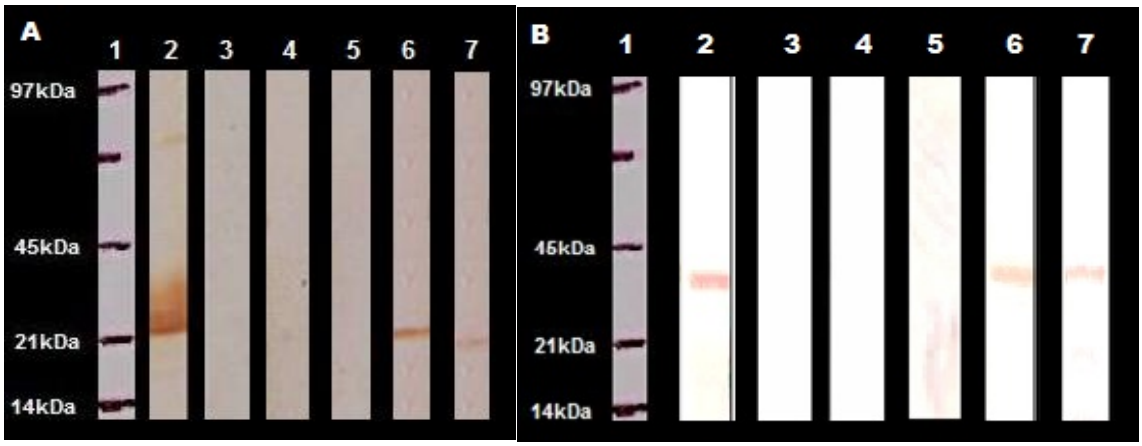
Figura 15- Detecção de anticorpos IgA sérico e secretados anti-Intimina de camundongos imunizados via oral com as vacinas rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina.



Grupos de 5 camundongos C57Bl/6 fêmea foram imunizados de acordo com o regime padrão de imunização e os soros e as fezes de cada grupo coletados 15 dias após a última imunização para analise de anticorpos anti-BfpA por *Immunoblotting*. 1- PM, 2- Intimina purificada (25 µg/mL) (controle positivo), 3- soro do grupo PBS, 4- fezes do grupo PBS, 5- soro do grupo Smeg vazio, 6- fezes do grupo Smeg vazio, 7- soro do grupo BCG vazio, 8- fezes do grupo BCG vazio, 9- soro do grupo rSmeg-Intimina, 10- fezes do grupo rSmeg-Intimina, 11- soro do grupo rBCG-Intimina e 12- fezes do grupo rBCG-Intimina.

Para demonstrar que a imunização intraperitoneal de camundongos com as vacinas recombinantes rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA ou rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina também levaramà produção de anticorpos IgG específicos anti-BfpA ou anti-Intimina, amostras da proteína recombinante BfpA (**Figura 16A**) ou Intimina (**Figua 16B**) purificadas foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE, eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e detectadas por meio de imunoensaio usando anticorpos IgG provenientes dos soros dos camundongos imunizados. Pode-se observar, na **Figura 16 A** e **B,** que os anticorpos séricos IgG dos grupos de camundongos imunizados com as vacinas recombinantes foram capazes de reconhecer as proteínas BfpA ou Intimina de forma específica (**A- linha 6, rSmeg-BfpA** e **linha 7, rBCG-BfpA**, **B- linha 6, rSmeg-Intimina**e **linha 7, rBCG-Intimina**). Não foi observada nenhuma banda utilizando os soros dos animais dos grupos controles (**A- linha 3, PBS, linha 4, Smeg** e **linha 5, BCG**, **B- A- linha 3, PBS, linha 4, Smeg** e **linha 5, BCG**). Os controles positivos (IgG anti-BfpA ou anti-Intimina) foram capazes de reconhecer as proteínas recombinantes purificadas BfpA (**A- linha 2**) ou Intimina (**B-linha 2**).

Figura 16- Detecção das proteínas recombinantes BfpA e Intimina por anticorpos anti-BfpA ou anti-Intimina presentes no soro dos camundongos imunizados com as vacinas rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA ou rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina.



Os soros coletados dos animais imunizados intra-peritonealmente com as vacinas rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA ou rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina, de acordo ao regime padrão de vacinação, foram usados para detecção das proteínas BfpA ou Intimina pelo método de*Immunoblotting*.**A-**1- PM, 2- BfpA purificada (25 µg/mL) (controle positivo), 3- soro do grupo PBS, 4- soro do grupo Smeg vazio, 5 - soro do grupo BCG vazio, 6- soro do grupo rSmeg-BfpA e 7- soro do grupo rBCG-BfpA.**B-** 1- PM, 2- Intimina purificada (25 µg/mL) (controle positivo), 3- soro do grupo PBS, 4- soro do grupo Smeg vazio, 5 - soro do grupo BCG vazio, 6- soro do grupo rSmeg-Intimina e 7- soro do grupo rBCG-Intimina.

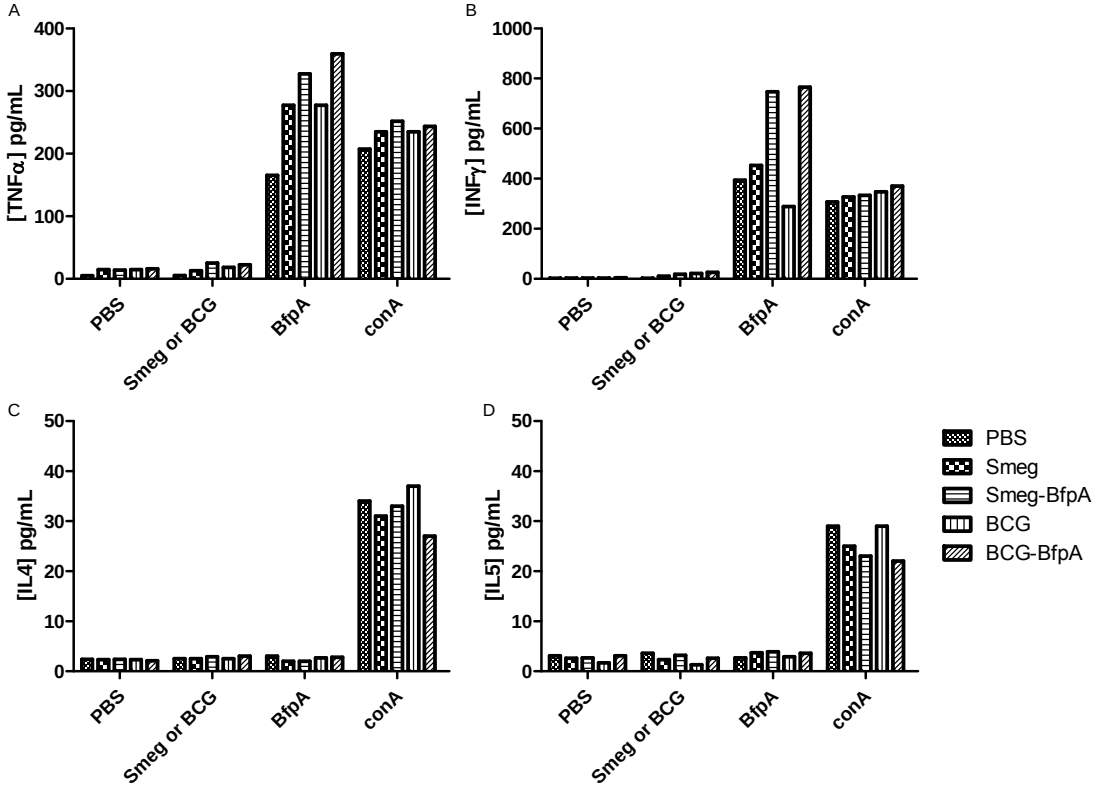
5.9 Avaliação das citocinas produzidas *in vitro*

Para a avaliação das citocinas produzidas, e também para a caracterização da tendência da resposta imunológica (Th1 ou Th2), as células esplênicas dos animais imunizados por via oral foram isoladas após 60 dias da primeira imunização, cultivadas e reestimuladas por 48 h*in vitro* como segue: 1- **nada** ou somente meio; 2- extrato total de proteínas solúveis de cultivo de **Smeg** vazia ou **BCG** vazia (25 µg/mL); 3- proteína recombinante BfpA ou Intimina (25 µg/mL); e 4- ConA (5 µg/mL) como controle positivo. O sobrenadante destas culturas foi utilizado para a determinação da concentração das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-4 e IL-5.

Conforme mostrado na **Figura 17**, os grupos dos camundongos imunizados com as vacinas recombinantes expressando BfpA e co-administradas com a sílica SBA-15 apresentaram um aumento na produção de TNF-α e IFN-γ somente quando foram estimuladas com a proteína BfpA purificada. Embora os controles também tenham apresentado um aumento, este aconteceu em escala menor. Resultado similar também foi encontrado nos grupos dos camundongos imunizados com as

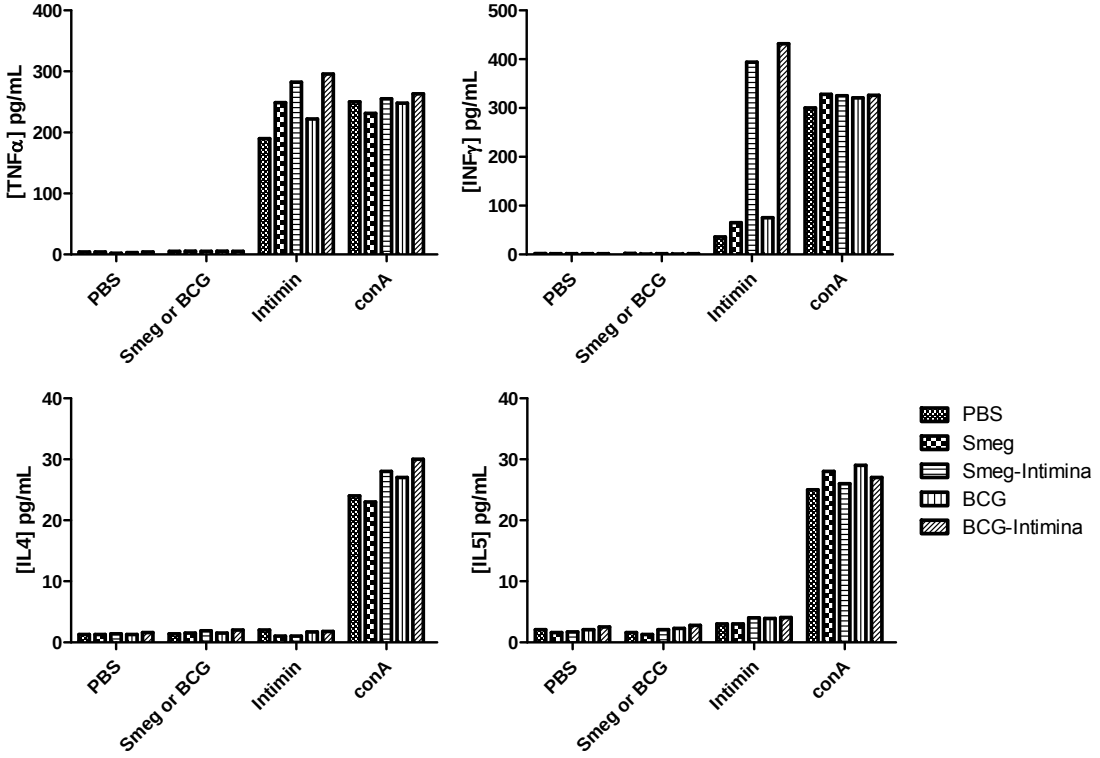
vacinas recombinantes, expressando a proteína Intimina (rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina), e co-administrada com a sílica SBA-15. Houve um aumento expressivo na produção de IFN-γ quando comparado aos grupos controles, somente sob estimulação com a proteína purificada Intimina (**Figura 18).** Diferentemente do resultado com BfpA, aqui não aconteceu estímulo inespecífico nos grupos controle. Já a produção de TNF-α seguiu a mesma tendência dos resultados com BfpA. Também não houve produção significativa de IL-4 ou IL-5 em nenhum dos grupos analisados.

Figura 17- Produção de citocinas após reestímulo *in vitro* de esplenócitos de camundongos imunizados via oral com as vacinas recombinantes que expressam BfpA.



Produção antígeno-específica de **(A)** TNF-α; **(B)** IFN-γ; **(C)** IL-4; e **(D)** IL-5 de esplenócitos de camundongos imunizados via oral com rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA, foi estimada após estímulos com extrato total de proteínas solúveis de cultivo de Smeg ou BCG (25 µg/mL); proteína recombinante BfpA purificada (25 µg/mL) e ConA (5 µg/mL), como controle positivo. Resultado representativo de 3 experimentos.

Figura 18- Produção de citocinas após reestímulo *in vitro* de esplenócitos de camundongos imunizados via oral com as vacinas recombinantes que expressam Intimina.

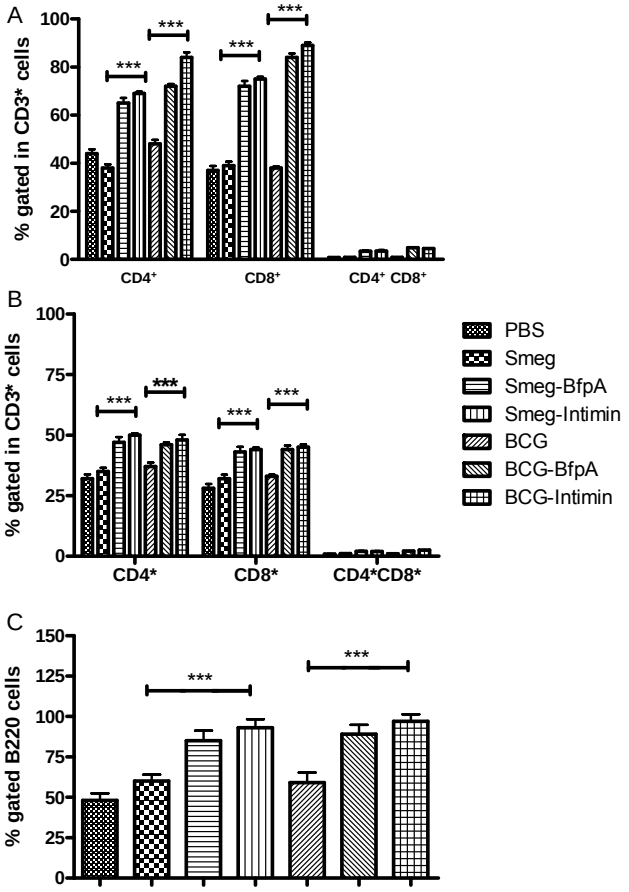


Produção antígeno-específica de **(A)** TNF-α, **(B)** IFN-γ, **(C)** IL-4, e **(D)** IL-5 de esplenócitos de camundongos imunizados via oral com rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina foi estimada, após estímulos com extrato total de proteínas solúveis originadas do cultivo de Smeg ou BCG; proteína recombinante Intimina purificada e ConA, como controle positivo. Resultado representativo de 3 experimentos.

5.10 Avaliação dos linfócitos no Baço dos animais imunizados

Para continuar avaliando o perfil da resposta imune, analisaram-se por citometria de fluxo o número de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ e de células B $B220^+$ nas suspensões celulares preparadas a partir do baço de camundongos imunizados com as vacinas recombinantes. Conforme a **Figura 19** pode-se verificar no dia 60° após o início das imunizações aumento do número de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ e de células B $B220^+$ no baço dos camundongos imunizados com as vacinas recombinantes em relação ao número de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ e de células B $B220^+$ no baço dos animais controles imunizados com PBS, Smeg vazio ou BCG vazio, tanto via oral quanto via intraperitoneal. No primeiro dia da imunização não se observa diferença entre os grupos experimentais (dados não apresentados).

Figura 19- Avaliação do aumento de linfócitos T e B presentes no baço de camundongos imunizados VO e IP com as vacinas recombinantes que expressam BfpA ou Intimina.



Camundongos C57BL/6 foram imunizados com rSmeg e rBCG quem expressam BfpA ou Intimina VO ou IP. Como controle, animais recebeeram apenas PBS ou Smeg vazio ou BCG vazio. Após 4 imunizações, avaliou-se os tipos celulares encontrados no baço dos animais. **A-** Linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ do baço dos camundongos imunizados com as vacinas via oral, **B-** Linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ do baço dos camundongos imunizados com as vacinas via intraperitoneal, **C-** Linfócitos $B220^+$ do baço dos camundongos imunizados com as vacinas via oral. Os resultados foram expressos em média ± SD e representativos de dois experimentos independents. Análise feita pelo teste paramétrico*t* de Student, $^{***}p < 0{,}001$.

5.11 Ensaio de inibição de adesão de EPEC a células Hep-2

Com a falta de um modelo animal para se avaliar a eficiência vacinal, optamos por um modelo *in vitro*, um ensaio de inibição de adesão de EPEC a células Hep-2. Os soros e o extrato obtido das fezes dos animais imunizados, via oral, e os soros dos animais imunizados via intraperitoneal, foram processadas, utilizadas e normatizadas para o título de 1:4. A concentração de EPEC utilizada (10^6UFC/mL) seguiu o protocolo estabelecido por Ferreira et al. (2008). Os soros ou

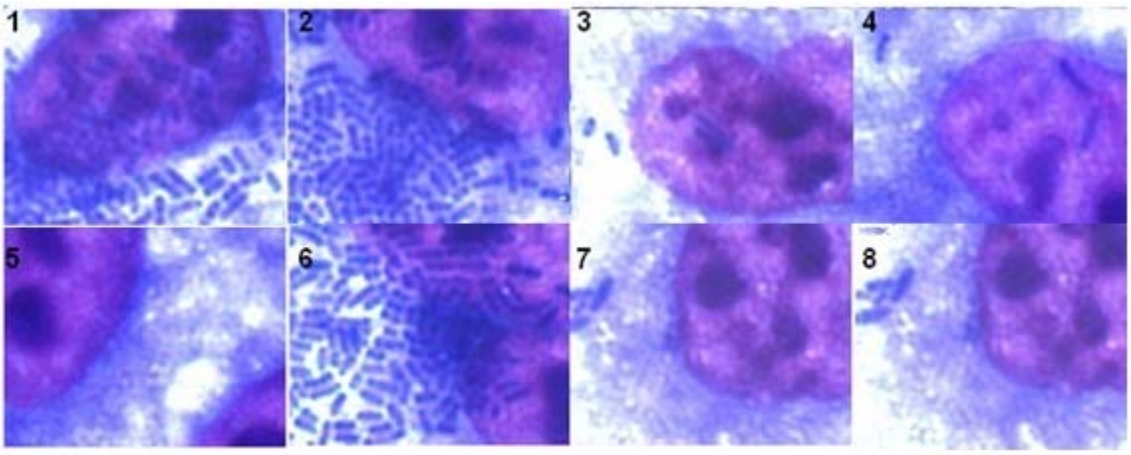
extratos das fezes foram incubados em placas com a linhagem protótipo de EPEC E2348/69 a 37 °C por 1h. Em seguida, as placas contendo as células Hep-2 receberam a EPEC juntamente com o soro ou extrato de fezes previamente incubadas por 1h e esse novo sistema foi re-incubado por mais 3h a 37°C. Após o período de incubaçao e lavagem, as células foram fixadas com metanol 70% por 30 min e coradas com corante May-Grunwald por 5 min/Giemsa por 20 min. A adesão foi fotodocumentada em microscópio óptico sob aumento de 1.000 vezes.

Os soros (**Figura 20**) e as fezes (**Figura 21**) obtidos dos animais imunizados, via oral, que receberam as vacinas recombinantes contendo as proteínas BfpA ou Intimina (**Figura 20, 1- PBS, 2- Smeg, 3- rSmeg-BfpA, 4- rSmeg-Intimina, 5- cultura celular, 6- BCG, 7- rBCG-BfpA, 8- rBCG-Intimina; Figura 21, 1- PBS, 2- Smeg, 3- rSmeg-BfpA, 4- rSmeg-Intimina, 5- cultura celular, 6- BCG, 7- rBCG-BfpA, 8- rBCG-Intimina)** demonstraram uma capacidade superior a 90% de inibir a adesão da EPEC E2348/69 nas células Hep-2 em relação aos animais que receberam PBS ou Smeg vazio ou BCG vazio que não foram capazes de inibirem a adesão.

Os soros obtidos dos animais imunizados, via intraperitoneal, que receberam as vacinas recombinantes contendo as proteínas BfpA (**Figura 22, 1- PBS, 2- Smeg, 3- rSmeg-BfpA, 4- rSmeg-Intimina, 5- cultura celular, 6- BCG, 7- rBCG-BfpA, 8- rBCG-Intimina**) demonstraram uma capacidade superior a 90% de inibir a adesão da EPEC E2348/69 nas células Hep-2 em comparação aos animais que receberam PBS ou Smeg vazio ou BCG vazio que não foram capazes de inibirem a adesão.

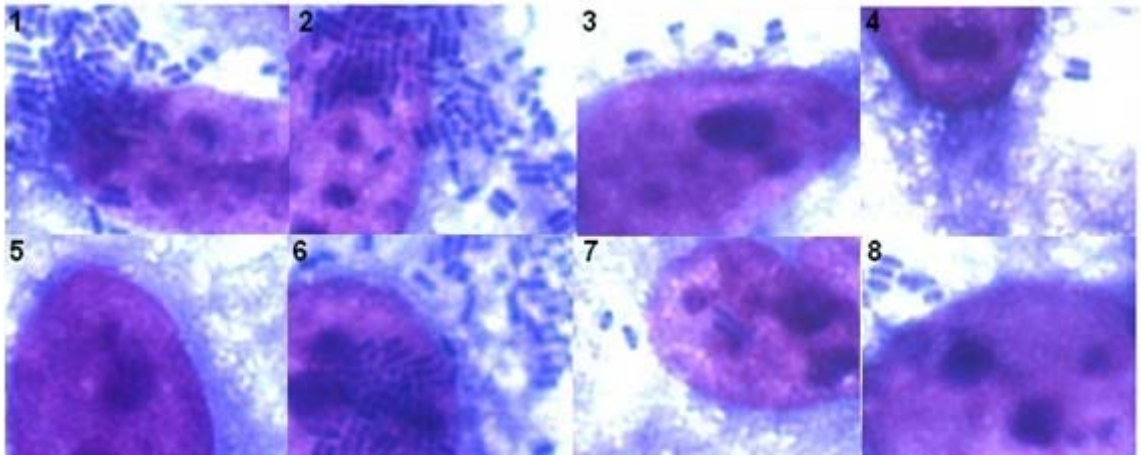
Os ensaios utilizando soro e fezes pré-imune, nas mesmas concentrações dos soros anti-BfpA e anti-Intimina, demonstraram incapacidade em inibir a adesão de EPEC à células Hep-2 (dados não mostrados).

Figura 20- Avaliação da capacidade de inibição da adesão de EPEC típica (E2348/69) por anticorpos presentes no soro de camundongos imunizados oralmente com vacinas recombinantes expressando BfpA ou Intimina.



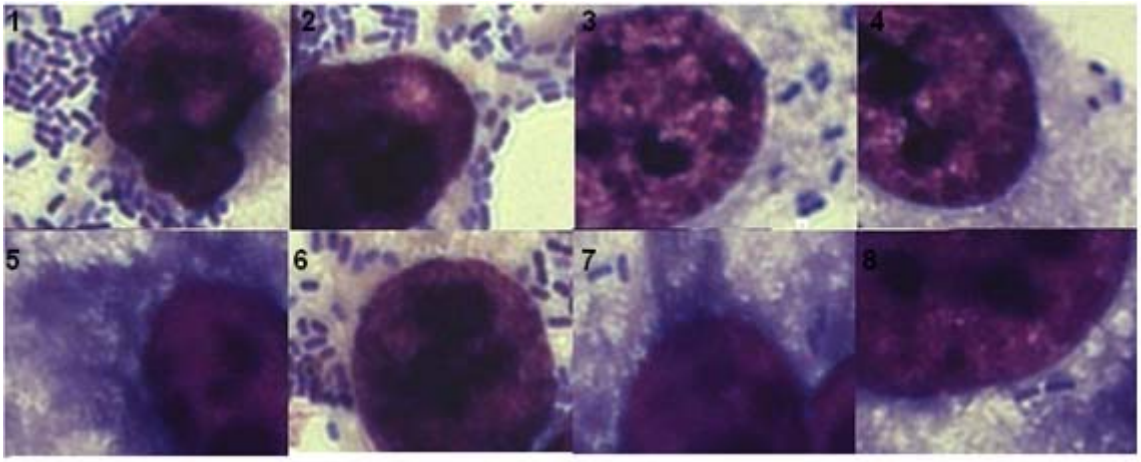
A capacidade de inibição a adesão à celulas Hep-2 por EPEC, previamente incubada com soro obtidos das imunizaçoes com as vacinas recombinantes rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA ou rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina ou os controles, foi avaliada por meio de contagem padrão de aderência localizada em células Hep-2. 1- PBS, 2- Smeg, 3- rSmeg-BfpA, 4- rSmeg-Intimina, 5- cultura celular, 6- BCG, 7- rBCG-BfpA, 8- rBCG-Intimina.

Figura 21- Avaliação da capacidade de inibição da adesão de EPEC típica (E2348/69) por anticorpos presentes nas fezes de camundongos imunizados oralmente com vacinas recombinantes expressando as proteínas BfpA ou Intimina.



A capacidade de inibição a adesão à celulas de Hep-2 por EPEC, previamente incubada com extratos de fezes obtidos das imunizaçoes com as vacinas recombinantes rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA ou rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina ou os controles, foi avaliada por meio de contagem padrão de aderência localizada em células Hep-2. 1- PBS, 2- Smeg, 3- rSmeg-BfpA, 4- rSmeg-Intimina, 5- cultura celular, 6- BCG, 7- rBCG-BfpA, 8- rBCG-Intimina.

Figura 22- Avaliação da capacidade de inibição da adesão de EPEC típica (E2348/69) por anticorpos presentes no soro de camundongos imunizados intraperitonealmente com vacinas recombinantes expressando BfpA ou Intimina.



A capacidade de inibição a adesão à celulas Hep-2 por EPEC, previamente incubada com soros obtidos das imunizaçoes com as vacinas recombinantes rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA ou rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina ou os controles, foi avaliada por meio de contagem padrão de aderência localizada em células Hep-2. 1- PBS, 2- Smeg, 3- rSmeg-BfpA, 4- rSmeg-Intimina, 5- cultura celular, 6- BCG, 7- rBCG-BfpA, 8- rBCG-Intimina.

6DISCUSSÃO

A diarreia infantil é responsável por mais de dois milhões de mortes em crianças menores de cinco anos anualmente em todo o mundo. A grande maioria das mortes ocorre em países em desenvolvimento, na primeira infância, onde a EPEC é um dos principais agentes bacterianos envolvidos. Más condições sócio-econômicas e subnutrição são causas decorrentes que favorecem a existência e manutenção da contaminação por *E. coli* no meio ambiente (FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2000).

As medidas direcionadas à prevenção, tratamento e controle de infecções envolvem vigilância epidemiológica permanente e em grande escala. A imunoprofilaxia, ou vacinação, é a medida mais eficiente e menos onerosa na prevenção de doenças infecciosas. Para se desenvolver uma imunidade é necessário que o indivíduo a receba por meio materno ou a adquira no decorrer de sua vida, seja através do contato com patógenos ou através de vacinas administradas desde o nascimento. A erradicação da varíola e o sucesso das vacinas tríplice (DTP - difteria, tétano e pertussis, ou tosse comprida) e Sabin são provas contundentes da importância desses programas de vacinação. No entanto, fatores culturais, sociais e econômicos dificultam a realização de diversas campanhas de vacinação, especialmente em países em desenvolvimento, onde os sistemas de saúde são por vezes déficitários. Essa conjuntura levou a comunidade científica a um esforço para desenvolver vacinas multivalentes. A eficiência de uma vacina é determinada pela especificidade, magnitude, duração da imunidade protetora e, sobretudo, indução de memória eficaz. Por mimetizarem a infecção natural, as vacinas com micro–organismos vivos normalmente não requerem a adição de adjuvantes; porém, as compostas por antígenos inativos ou recombinantes necessitam da adição dessas substâncias para indução de resposta imune eficaz. Em especial, procuram-se veículos vivos de apresentação de antígenos, uma vez que a expressão contínua do imunógeno poderia eliminar a necessidade de várias doses de reforço para se alcançar uma proteção máxima, o que é o caso de várias vacinas atualmente em uso. Veículos que têm sido particularmente investigados são: *Vaccínia*, *Salmonella* atenuada, *Mycobacterium smegmatis* ou BCG (Bacilo Calmette-Guerin, vacina contra a tuberculose), com resultados estimulantes (LEVINE et al., 1985).

A imunização por via de mucosa traz uma série de vantagens em relação à administração de vacinas por vias parenterais, como a ausência de riscos de

transmissão de doenças, uma maior aceitação por parte da população, facilidade na administração e, principalmente, a capacidade de estimular respostas imunológicas secretoras capazes de bloquear a entrada de patógenos pelas vias mucosas. Existem diversas estratégias para o desenvolvimento de vacinas de mucosas dentre as quais podem ser citadas os sistemas que protegem os antigenos vacinais da degradação durante a passagem pelo trato gastro intestinal, como lipossomos e formas atenuadas de vírus e bactérias patogênicas. Apesar de largamente empregada, a estratégia de utilizar vírus ou bactérias atenuadas gera dúvidas sobre a segurança, uma vez que, apesar de remota, existe a possibilidade de reversão da atenuação.

Dados de imunização com a vacina contra Hepatite A em SBA-15 comparativamente aos da vacina e/ou vacina em $Al(OH)_3$corroboram os obtidos anteriormente e indicam a eficiência da SBA-15 em promover aumento nas respostas secundárias; esses resultados sugerem que essa nanopartículaatue positivamente na expansão e ativação de plasmócitos e linfócitos de memória, essenciais na eficácia de um processo de vacinação (CARVALHO, 2007).

Mantendo o pressuposto que uma vacina deva promover o efeito de proteção desejado com mínimos ou nulos efeitos adversos, estudamos durante este trabalho, antígenos como as proteínas BfpA e a Intimina, provenientes da *E. coli* enteropatogênica, visando o desenvolvimento de uma vacina contra EPEC.

Algumas tentativas têm sido feitas para se desenvolver vacinas contra *E. coli* enteropatogênica. Desde que as proteínas BfpA e Intimina são considerados os principais fatores de virulência de EPEC, muitos sistemas testados são baseados nestas proteínas. Tentativas de expressar as proteínas BfpA e Intimina tiveram êxito em *S. typhimurium aroA*,*Vibrio cholerae* CVD e *Lactobacillus casei* com produção de anticorpos (FERREIRA et al., 2008; SCHRIEFER et al., 1998).

Seguindo esse racional, construímos duas vacinas baseadas em *Mycobaterium smegmatis* e/ou BCG como veículo vivo para apresentação dos antígenos BfpA e Intimina, expressos individualmente.

A escolha das proteínas BfpA e Intimina como antígenos alvo foi baseada em dados epidemiológicos e pela capacidade de produção de anticorpos específicos contra estas proteínas impedirem a adesão de EPEC em culturas celulares. Neste estudo observamos a capacidade de indução de anticorpos específicos contra estas proteínas, a caracterização dos isótipos preferencialmente induzidos e a resposta

celular representada pela produção de citocinas por células esplênicas dos camundongos imunizados com vacinas recombinantes que expressem esses antígenos. Estudos anteriores mostraram que o repertório de anticorpos anti-BfpA e anti-Intimina torna-se grande após os primeiros dozes meses de vida, se igualando ao repertório de um adulto. Isso deve-se a presença de anticorpos contra esses fatores de virulência de EPEC no colostro e no leite materno, ou pelo contato com a bactéria, sem causar doença sintomática (CARBONARE et al., 2003).

Inicialmente tivemos que clonar os genes *bfp*A e *intimina* no plasmídeo de expressão de micobactérias, pMIP12 e caracterizar a expressão dessas proteínas em *M. smegmatis* e BCG recombinantes. O vetor pMIP12, como descrito em material e método, possui o promotor forte pBlaF* de *M. fortuitum* e uma sequência de ligação ribossomal (RBS) que ajuda na síntese proteíca. Os genes de interesse foram amplificados e clonados com sucesso a partir dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados especificamente para amplificar a sequência gênica completa de *bfpa* e a porção $Int_{388-667}$ do gene *intimina,* ambas responsáveis pela adesão de EPEC em estágios diferentes da infecção. Em nossos experimentos a expressão das proteínas BfpA e Intimina em cepas de *M. smegmatis* e BCG recombinantes foi confirmada através do "*immunoblotting*" de extratos totais solúveis das linhagens de rSmeg-*bfp*A, rSmeg-*intimina*, rBCG-*bfp*A e rBCG-*intimina* usando os respectivos soros anti-BfpA ou anti-Intimina produzidos em camundongos a partir dessas proteínas purificadas em nosso laboratório. Além disso, outro imunoensaio mostrou que as proteínas recombinantes também foram reconhecidas por anticorpos específicos presentes nos soros ou extratos de fezes obtidos dos animais imunizados com essas vacinas recombinantes, corroborando assim o resultado anterior.

Além do nível de expressão e localização de um antígeno heterólogo num vetor vivo, um outro fator que influencia a indução de uma resposta imunológica efetiva neste tipo de vacina é a estabilidade do sistema de expressão. Vetores integrativos são conhecidos por mostrarem menor nível de expressão, mas uma maior estabilidade. Por outro lado, plasmídeos possibilitam um nível de expressão maior, pelo fato de haver até 5 cópias por bactéria, porém apresentam menor estabilidade *in vivo*. Todavia, em nossos experimentos as proteínas BfpA e Intimina continuavam sendo expressas com o mesmo vigor mesmo depois da última imunização. Embora muitos sistemas de expressão micobacterianos,

compreendendo antígenos, diferentes tenham sido investigados, pouco tem sido feito para caracterizar a estabilidade destes sistemas baseados em plasmídeos. A expressão das proteínas BfpA e Intimina sob o controle do promotor pBlaF* em cepas de *M. semgmatis* e BCG, foi constatada através do "*immunoblotting*" de extratos das linhagens de rSmeg-*bfp*A, rSmeg-*intimina*, rBCG-*bfp*A e rBCG-*intimina*, conforme Figuras 9 e 10.

Uma vez confirmada a expressão, iniciamos os ensaios de imunização por via oral ou via intraperitoneal e caracterização da resposta imunológica humoral e celular em camundongos seguindo um regime de vacinação padrão. Nesse regime padrão de vacinação optamos por acrescentar a sílica SBA-15 para ser co-administrada com as vacinas recombinantes na imunização pela via oral, pois as bactérias recombinantes são adsorvidas pela sílica, fato que potencializa a resposta imune devido a proteção e liberação controlada desses antígenos nos processos de imunização oral Além do mais, facilita a captura dos antígenos pelas APC e protege alguns epítopos contra degradação enzimática ao passarem pelo trato gastrointestinal (CARVALHO et al., 2010). O uso da SBA-15 também se justifica pela não polarização da resposta imune. Estudos anteriores demonstraram que essa micropartícula, ao contrário do $Al(OH)_3$ comumente utilizado como adjuvante e forte indutor de resposta Th2, não interfere no direcionamento Th1/Th2, sendo a resposta direcionada exclusivamente pela natureza antígeno utilizado e via de administração (CARVALHO et al., 2010). Sabe-se, ainda,que o uso adicional de adjuvantes de mucosa são fundamentais para um bom nível de indução de resposta imune humoral (FERREIRA et al., 2008).

Com o uso da vacinação, o organismo é estimulado a produzir anticorpos que possam garantir a sua proteção contra um determinado patógeno, sendo assim o ponto de partida para análise da capacidade imunogênica das proteínas BfpA e Intimina.

Ao ser inoculada em camundongos, as vacinas recombinantes que expressam as proteínas BfpA ou Intimina, juntamente com a SBA-15 nas imunizações orais, foram capazes de induzir a produção de anticorpos contra essas mesmas proteínas purificadas, mostrando assim, que esses animais foram capazes de produzir anticorpos protetores contra fatores de virulência de EPEC, e que os animais que receberam PBS, Smeg vazio ou BCG vazio, também junto com a SBA-15 foram capazes de produzirem menores quantidades de anticorpos específicos

contra essas proteínas, entretanto, tais anticorpos comprovadamente não são protetores como observados nos resultados dos experimentos de adesão a células Hep-2. Os grupos de camundongos que receberam as vacinas via oral, foram capazes de produzirem níveis elevados de IgA e os grupos que receberam as vacinas via intraperitoneal foram capazes de estimular a produção de IgG específicos, resultados encontrados também quando camundongos C57Bl/6 foram imunizados via intranasal com *L. casei*-Int_{cv} e houve produção de IgG sérico e s-IgA da mucosa nasal específicos anti-Intimina (FERREIRA et al., 2008), ou quando coelhos foram imunizados via oral com CVD-$pInt_{248}$ e houve produção significante de IgA sérico e secretado. Camundongos BALB/C quando imunizados via oral com uma cepa de *Salmonela* que expressa a proteína recombinante BfpA também foram capazes de estimular o sistema imune humoral a produzir anticorpos específicos anti-BfpA (SCHRIEFER et al., 1999).

Camundongos C57Bl/6 submetidos ao regime vacinal padrão, com formulações baseadas em bactérias recombinantes com a sílica SBA-15 via oral, demonstraram que o sistema baseado no vetor pMIP12 é funcional para a imunização com as duas proteínas, sendo a geração de títulos de anticorpos IgA específicos tanto no soro quanto nas fezes similares *in vivo*.

As respostas de anticorpos específicos contra BfpA e Intimina no soro ou secretados na mucosa intestinal (fecal) apresentaram níveis detectáveis de s-IgA específicos. Os títulos mais elevados foram obtidos após a quarta imunização, demonstrando ser dose e tempo dependentes, seguindo esse esquema vacinal. Apesar das cepas de Smeg e BCG vazias também aumentarem o título de anticorpos após a 4ª imunização, comprovou-se através do *blotting* (Figuras 14 e 15) que não se trata de anticorpos específicos, pois os mesmos não reconheceram as proteínas recombinantes purificadas e também não foram eficientes em impedirem a adesão de EPEC nas células Hep-2 (Figuras 20, 21 e 22).

O tipo de resposta Th1, que favorece uma resposta mediada por células, é acompanhada pela produção de anticorpos IgG2a e o tipo de resposta Th2, que promove o auxílio por células B, é caracterizada pela produção de anticorpos IgG1 (GUY, 2007). Há amplas evidências de que esses padrões de resposta de células Th são importantes para mediar a resistência a diversos agentes infecciosos (SHER et al., 1991). Sabendo que a caracterização do tipo de resposta é de grande importância para que um antígeno vacinal seja eficiente no combate ao patógeno, foi

avaliada a tendência da produção de isótipos IgG1 e IgG2a nos soros dos camundongos e a população celular do baço dos camundongos usados neste trabalho.

Os grupos vacinados com rSmeg-BfpA ou rBCG-BfpA ou rSmeg-Intimina ou rBCG-Intimina mostraram um aumento significativo de IgG2a anti-BfpA ou anti-Intimina com relação a produção de IgG1 e comparado com os grupos controles, apresentando um aumento do tipo de resposta Th1 celular. Esses resultados sugerem que a resposta estimulada pelas proteínas BfpA e Intimina é a estimulação da resposta imune Th1, o que também foi reafirmado com o aumento do número de linfócitos T e B no baço dos camundongos imunizados com as vacinas recombinantes. Outro regime vacinal com *Salmonela* expressando a proteína CFA de *E. coli* Entetotoxigênica revelou, também, uma resposta predominantemente de anticorpos IgG2a, neste mesmo trabalho para confirmar a resposta imune Th1 foi mensurada a quantidade das citocinas IFN--γ e IL4 secretadas pelos linfócitos $TCD4^+$ presentes no sobrenadante de esplenócitos dos camundongos vacinados (LAZARO et al., 2004).

Assim como utilizamos as análises de isótipos de anticorpos para tentar caracterizar o tipo de resposta imune induzida pelas proteínas BfpA e Intimina, também o fizemos com relação à produção de citocinas e ao número de linfócitos presentes no baço dos animais imunizados com as vacinas recombinantes. Em nosso estudo, células dos baços obtidos de camundongos i.p. e v.o. imunizados com as vacinas recombinantes, mostraram um significante aumento do número de células T e B e na produção de TNF-α e IFN-γ quando reestimuladas com as proteínas purificadas. De maneira geral, os níveis de TNF-α e IFN-γ foram mais altos que os de IL-4 ou IL-5, sugerindo que houve a indução de uma resposta Th1 dominante.

A avaliação da efetividade dos anticorpos gerados foi realizada *in vitro* pelo método de inibição de adesão de EPEC em cultura celular, devido a escassez de modelos animais adequados para a validação de estratégias vacinais voltadas para EPEC, como realizado em trabalhos anteriores, onde também conseguiram a inibição da aderência de EPEC a células Hep-2 ou HeLa (ALMEIDA et al., 2003; FERREIRAet al.,2008). Este ensaio testou a capacidade neutralizante e a especificidade dos anticorpos. Após padronização do teste com a diluição sendo feita de 1:4 os ensaios confirmaram os resultados iniciais obtidos com o

reconhecimento das proteínas BfpA e Intimina expressas na superfície das bactérias por anticorpos gerados pelo regime vacinal oral e intraperitoneal, inibindo num percentual superior a 90% a adesão de EPEC à células Hep-2. O soro das bactérias Smeg vazio e BCg vazio não foram capazes de inibir a adesão de EPEC a cultura celular, como exemplificado nas Figuras 20, 21 e 22. Recordando, o soro pré-imune não apresentou qualquer reatividade com as proteínas purificadas. Nossos resultados confirmaram que os anticorpos produzidos foram eficientes em inibir a aderência de EPEC à células epiteliais, assim como estudos anterios que demonstrarm que os anticorpos IgA de colostro humano inibiram a aderência de EPEC em células Hep-2 (CARBONARE et al., 2003). Uma larga evidência indica que Intimina além de interagir com o receptor Tir produzido pela própria EPEC, também interage com receptores codificados pelas células do hospedeiro, mas essas a relevância dessas interações *in vivo* ainda não está completamente entendida (SINCLAIR et al., 2006). É possível que anticorpos produzidos anti- Intimina também bloqueiem essas interações.

Ao final deste trabalho concluimos que as proteínas BfpA e Intimina expressas por linhagens vacinais de Smeg e BCG representam importantes antígenos alvo, particularmente para promover a proteção contra EPEC típicas.

Esses resultados trazem contribuições relevantes, em especial para o estudo sobre as relações de reconhecimento e indução da memória imunológica a essas proteínas e do fenômeno das interações patógeno-hospedeiro.

7CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, foi possível chegar as seguintes conclusões:

- foi possível a clonagem dos genes *bfp*A e *intimina* no plasmídeo de expressão pMIP12;
- as cepas de *M. smegmatis* e BCG expressam as proteínas BfpA e Intimina;
- as proteínas expressadas pelas vacinas recombinantes foram capazes de induzir a produção de anticorpos IgA e IgG (principalmente subclasse IgG2a) específicos;
- induziu a produção das citocinas IFNγ e TNFα
- modulou a resposta imune para Th1;
- os anticorpos específicos produzidos foram capazes de inibirem a adesão de EPEC à células Hep-2, mostrando eficaz;
- esse sistema mostrou-se um bom candidato para uma possível vacina anti-EPEC.

Certamente, outros estudos com relação a resposta imune, à interação patógeno-hospedeiro e ao modelo animal para o desafio ainda são necessários para um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na doença, de modo a permitir o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura contra EPEC.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ADU-BOBIE, J.; TRABULSI, L. R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G.Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin from enteropathogenic Escherichia coli. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5643-5649, 1998.

AFZALI, B.; LOMBARDI, G.; LECHLER, R.I.; LORD, G.M. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 148, p. 32-36, 2007.

AKDIS, C.A.; OZDEMIR, C.; AKDIS, M. T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. **Clin. Exp. Allergy**, v. 39, p. 626-639, 2009.

ALMEIDA, C. M.; QUINTANA-FLORES, V. M.; MEDINA-ACOSTA, E.; SCHRIEFER, A.; BARRAL-NETTO, M.; DIAS DA SILVA, W. Egg yolk anti-BfpA antibodies as a tool for recognizing and identifying enteropathogenic Escherichia coli.**Scand. J. Immunol.**, v. 57, n. 6, p.573-582, 2003.

ANVIKAR, A. R.; DOLLA, C.; DUTTA, S.; RAO, V. G.; GADGE, V. S.; SHUKLA, G. P.; RAO, S.; KARFORMA, C.Role of Escherichia coli in acute diarrhoea in tribal preschool children of central India.**Paediatr. Perinat.Epidemiol.**,v. 1, p. 40-46, 2008.

BARNETT-FOSTER, D.; PHILPOTT, D.; ABUL-MILH, M.; HUESCA, M.; SHERMAN, P. M.; LINGWOOD, C. A. Phosphatidylethanolamine recognition promotes enteropathogenic E. coli and enterohemorrhagic E. coli host cell attachment. **Microb. Pathog.,**v. 27, n. 5, p. 289–301, 1999.

BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; CANDY, D. C.; MOON, H. W. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic Escherichia coli. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 2, p. 534–538, 1983.

BASTOS, R. G.; BORSUK, S.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant Mycobacterium bovis BCG. **Vaccine**, v. 27, p. 6495–6503, 2009.

BATCHELOR, M.; KNUTTON, S.; CAPRIOLI, A.; HUTER, V.; ZANIAL, M.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Development of a universal intimin antiserum and PCR primers.**J. Clin. Microbiol.**, v. 12, p. 3822-3827, 1999.

BEUTIN, L.; MARCHÉS, O.; BETTELHEIM, K. A.; GLEIER, K.; ZIMMERMANN, S.; SCHMIDT, H.; OSWALD, E. HEp-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing Escherichia coli strains isolated from healthy infants in Germany and Australia.**Infect.Immun.**, v. 7,p. 3995-4002, 2004.

---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEUTIN, L. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen.**J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.**, v. 53, p. 299-305, 2006.

BLACK, R. E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H. L.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; BASSANI, D. G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C. F.; CIBULSKIS, R.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis.**Lancet**, v. 9730, p. 1969-1987, 2010.

BLANCO, J. E.;BLANCO, M.;ALONSO, M. P.;MORA, A.;DAHBI, G.;COIRA, M. A.;BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999.**J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 311-319, 2004.

BLANCO, M.;BLANCO, J. E.;DAHBI, G.;ALONSO, M.P.;MORA, A.;COIRA, M. A.;MADRID, C.;JUÁREZ, A.;BERNÁRDEZ, M. I.;GONZÁLEZ, E. A.;BLANCO, J. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.**Int. Microbiol.**, v. 9,p. 103-110, 2006.

BLANK, T. E.; LACHER, D. W.; SCALETSKY, I. C.; ZHONG, H.; WHITTAM, T. S.; DONNENBERG, M. S. Enteropathogenic *Escherichia coli* O157 strains from Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**,v.9, n.1, p. 113–115, 2003.

BLANK, T. E.; ZHONG, H.; BELL, A. L.; WHITTAM, T. S.; DONNENBERG, M. S. Molecular variation among type IV pilin (*bfpA*) genes from diverse enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.***,* v. 68, n. 12, p. 7028–7038, 2000.

BLOOM, B. R.; MURRY, C. J. L. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. **Science**, v. 257, p. 1055–1064, 1992.

BLOOM, B. A; FINE, P. E. M. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis. In: WOODROW, G. C. (Ed.).**Tuberculosis**: pathogenesis, protection and control. Washington, DC, p. 531-558, 1994.

BRANDTZAEG, P.; JOHANSEN, F.E. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. **Immunol. Rev.**, v. 206, p. 32-63, 2005.

BRANDTZAEG, P.; FARSTAD, I. N.; JOHANSEN, F. E.; MORTON, H. C.; NORDERHAUG, I. N.; YAMANAKA, T. The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. **Immunol. Rev.**, v. 171, p. 45-87, 1999.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous satrains of Bact. coli neopolitanum from summer diarrhea of infants. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 57, p. 239-247, 1945.

BREWER, J.M. (How) do aluminium adjuvants work? **Immunol. Lett.**, v. 102, p. 5-10,2006.

BUERIS, V.;SIRCILI, M.P.; TADDEI, C. R.; DOS SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M, L.; TRABULSI, L. R.Detection

of diarrheagenic Escherichia coli from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, v.7, p. 839-844, 2007.

CARBONARE, C. B.; CARBONARE, S. B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Early acquisition of sérum and saliva antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins by infants living in na endemic área. **Pediatr. Allerg. Immunol.**, v. 14, p. 222-228, 2003.

CARVALHO, L. V. **Estudo experimental do efeito adjuvante da sílica SBA-15.** Dissertação (Mestrado em Imunologia)–Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CARVALHO, L. V.; RUIZ, R. C.; SCARAMUZZI, K.; MARENGO, E. B.; MATOS, J. R.; TAMBOURGI, D. V.; FANTINI, M. C.; SANT´ANNA, O. A. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. **Vaccine**,v. 28, p. 7829-7836, 2010.

CERUTTI, A.; RESCIGNO, M.The biology of intestinal immunoglobulin A responses.**Immunity,** v. 28,p. 740-750, 2008.

CLARK, S.; HAIGH, R.; FREESTONE, P.; WILLIAMS, P. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. **Clin. Microbiol.**, v. 16, n. 3, p. 365-378, 2003.

CLEARY, T. G.; GUERRANT, R. L.; PICKERING, M. D. Microorganisms responsible for neonatal diarrhea.In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O.**Infectious dieases of the fetus and newborn infant.**5th ed. 2001. p.1256-1265.

CLEARY, J.; LAI, L. C.; SHAW, R. K. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v. 150, p. 527-538, 2004.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut. MicroB.**, v. 3, n. 2, p. 71–87, 2012.

COFFMAN, R.L. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. **Nat. Immunol.**, v. 7, p.539-541, 2006.

CRAIG, L.; LI, J. Type IV pili: paradoxes in form and function. **Curr. Opin. Struct. Biol.***,* v. 18, n. 2, p. 267–277, 2008.

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; VILLAFAN, H.; RUIZ, J.; DEL VEDOVO, S.; NEESER, J. R. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. **J. Infect. Dis.***,* v. 163, n. 6, p. 1247–1255, 1991.

DONNENBERG, M. S.; GIRON, J. A.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 3427–3437, 1992.

DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B.Enteropathogenic *Escherichiacoli*.**Infect. Immun.,** v. 60, p. 3953–3961, 1992.

FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and mal nutrition. **São Paulo Med. J.**, v.118, p. 21-29, 2000.

FERNANDES, P. J.; GUO, Q.; DONNENBERG, M. S. Functional consequences of sequence variation in bundlin, the enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pilin protein. **Infect. Immun.***,* v. 75, n.10, p. 4687–4696, 2007.

FERNANDO, S. L.; BRITTON, W. J. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. **Immunol. Cell. Biol.**, v.84,p.125–137, 2006.

FERREIRA, P. C.; CAMPOS, I. B.; ABE, C. M.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; HO, P. L.; OLIVEIRA, M. L. Immunization of mice with Lactobacillus casei expressing intimin fragments produces antibodies able to inhibit the adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to cultivated epithelial cells.**FEMS. Immunol. Med. Microbiol.**, v. 54, n. 2, p. 245-254, 2008.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C.; KELLER, R.; GOMES, T. A.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L. R.Prevalence of diarrheagenic Escherichia coli in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil.**Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, v. 4, p. 359-363, 2005.

FRANKEL, G.;CANDY, D. C.;EVEREST, P.;DOUGAN, G.Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*.**Infect. Immun.**, v. 62,p. 1835-1842, 1994.

GARBE, T.; HARRIS, D.; VORDERMEIER, M.; LATHIGRA, R.; IVANYI, J.; YOUNG, D. Expression of the Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton antigen in Mycobacterium smegmatis: immunological analysis and evidence of glycosylation. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 260-267, 1993.

GICQUEL, B. Towards new mycobacterial vaccines. **Dev. Biol. Stand.**, v. 82,p. 171–178, 1994.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundleforming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli.* **Science**,v.254, p. 710–713, 1991.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli.* **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 7391–7403, 1993.

GOOSNEY, D. L.; CELLI, J.; KENNY, B.; FINLAY, B. B.Enterophatogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. **Infect. Immun.,** v. 67, p. 490-495, 1999.

GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.5, p. 505-517, 2007.

HASE, K.; KAWANO, K.; NOCHI, T.; PONTES, G. S.; FUKUDA, S.; EBISAWA, M.; KADOKURA, K.; TOBE, T.; FUJIMURA, Y.; KAWANO, S.; YABASHI, A.; WAGURI, S.; NAKATO, G.; KIMURA, S.; MURAKAMI, T.; IIMURA, M.; HAMURA, K.; FUKUOKA, S.; LOWE, A. W.; ITOH, K.; KIYONO, H.; OHNO, H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response.**Nature**, v. 12, n. 462, p. 226-230, 2009.

HATHAWAY, L. J.; KRAEHENBUHL, J. P. The role of M cells in mucosal immunity. **Cell.Mol. Life Sci.**, v. 57, n. 2, p. 323-332, 2000.

HIEN, B. T.; SCHEUTZ, F.; CAM, P. D.; SERICHANTALERGS, O.; HUONG, T. T.; THU, T. M.; DALSGAARD, A. Diarrheagenic Escherichia coli and Shigella strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam. **J. Clin.Microbiol.**, v. 3,p. 996-1004, 2008.

HUMPHRIES, R. M.; DONNENBERG, M. S.; STRECKER, J. From a to b: identification of amino acids required for the *N*-acetyllactosaminespecific lectin-like activity of bundlin. **Mol. Microbiol.***,* v. 72, n. 4, p. 859–868, 2009.

HYLAND, R. M.; BECK, P.; MULVEY, G. L.; KITOV, P. I.; ASMSTRONG, G. D. N-acetyllactosamine conjugated to gold nanoparticles inhibits enteropathogenic *Escherichia coli* colonization of the epithelium in human intestinal biopsy specimens. **Infect. Immun.**, v.79, n. 9, p. 5419-5421, 2006.

IWASAKI, A.; KELSALL, B.L. Mucosal immunity and inflammation. I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p.1074-1078, 2008.

JAFARI, F.; GARCIA-GIL, L. J.; SALMANZADEH-AHRABI, S.; SHOKRZADEH, L.; ASLANI, M. M.; POURHOSEINGHOLI, M. A.; DERAKHSHAN, F.; ZALI, M. R. Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals.**J. Infect.**, v. 1, p. 21-27, 2009.

JEONG, Y. J.; LEE, K. S. Pulmonary tuberculosis: up-to-date imaging and management. **AJR.Am. J. Roentgenol.**,v. 191, p. 834–844, 2008.

JERSE, A. E.;KAPER, J. B. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid.**Infect. Immun.**, v. 59, p. 4302-4309, 1991.

JERSE, A. E.; YU, J.; TALL, B. D.; KAPER, J. B.A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 87, p. 7839–7843, 1990.

JOHANSSON, C.; KELSALL, B. L. Affecting the effectors: a kick in the gut?**Nat. Immunol.**, v. 6, n. 7, p. 644-646, 2005.

JONSDOTTIR, I.; HANNESDOTTIR, S.G.; OLAFSDOTTIR, T.A.; GIUDICE, G.D. Adjuvants LT-K63 and CPG enhance the activation of dendritic cells in neonatal mice. **Scand. J. Immunol.**, v. 68, p. 469-475, 2008.

KAIN, K. C.; BARTELUK, R. L.; KELLY, M. T.; HE, X.; DE HUA, G.; GE, Y. A.; PROCTOR, E. M.; BYRNE, S.; STIVER, H. G. Etiology of childhood diarrhea in Beijing, China.**J. Clin. Microbiol.**, v. 1, p. 90-95, 1991.

KNUTTON, S.; BALDWIN, T.; WILLIAMS, P. H.; MCNEISH, A. S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 4, p. 1290–1298, 1989.

KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLEN, M. J.; NISAN, I.; NEVES, B. C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G.A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO J.**, v.17, p. 2166–2176, 1998.

KOTLER, D. P.; ORENSTEIN, J. M.Chronic diarrhea and malabsorption associated with enteropathogenic bacterial infection in a patient with AIDS.**Ann. Intern. Med.**, v. 2, p. 127-128, 1993.

KRESGE, C. T.; LEONOWIEZ, M. E.; ROTH, W. J.; VARTULE, J. C.; BECK, J. S. Ordered mesopouros molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. **Nature**, v. 359, p. 710-712, 1992.

KUOLEE, R.; CHEN, W. Mcell-targeted delivery of vaccines and therapeutics. **Expert. Opin. Drug.Deliv.**, v. 5, n. 6, p.693-702, 2008.

LÁSARO, M. O.; LUIZ, W. B.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; NISHIMURA, L. S.; GUTH, B. E.; FERREIRA, L. C. Combined vaccine regimen based on parenteral priming with a DNA vaccine and administration of an oral booster consisting of a recombinant Salmonella enterica serovar Typhimurium vaccine strain for immunization against infection with human-derived enterotoxigenic Escherichia coli strains.**Infect. Immun.**, v. 72, n. 11, p. 6480-6491, 2004.

LE DANTEC, C.; WINTER, N.; GICQUEL, B.; VINCENT, V.; PICARDEAU, M.Genomic sequence and transcriptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid: evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems.**J. Bacteriol.**, v.7, p. 2157-2164, 2001.

LEBIEN, T.W.; TEDDER, T.F. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, v. 112, p. 1570-1580, 2008.

LEVINE, M. M.;NATARO, J.P.;KARCH, H.;BALDINI, M. M.;KAPER, J. B.;BLACK, R. E.;CLEMENTS, M. L.;O'BRIEN, A. D.The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor.**J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 550-559, 1985.

LUO, Y.; FREY, E. A.; PFUENTZNER, R. A.; CREAGH, A. L.; KNOECHEL, D.G.; HAYNES, C.A.; FINLAY, B. B.; STRYNADKA, C. J. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**,v. 405, p. 1073-1077, 2000.

MATHEWSON, J. J.; OBERHELMAN, R. A.; DUPONT, H. L.; JAVIER DE LA CABADA, F.; GARIBAY, E. V.Enteroadherent Escherichia coli as a cause of diarrhea among children in Mexico.**J. Clin. Microbiol.**, v. 10, p. 1917-1919, 1987.

MATOS, J. R.; MERCURI, L. P.; KRUK, M.; JARONIEC, M. Toward the synthesis of extra-large-pore MCM-41 analogues. **Chem. Mater.**, v. 13, p. 1726-1731, 1992.

MATSUO, K.; YAMAGUCHI, R.; YAMAZAKI, A.; TASAKA, H.; TERASAKA, K.; TOTSUKA, M. Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 4049–4054, 1990.

MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.92, n. 5, p. 1664–1668, 1995.

MEDERLE, I.; BOURGUIN, I.; ENSERGUEIX, D.; BADELL, E.; MONIZ-PEIREIRA, J.; GICQUEL, B. Plasmidic versus insertional cloning of heterologous genes in Mycobacterium bovis BCG: impact on in vivo antigen persistence and immune responses. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 303–314, 2002.

MERCURI, L. P.; CARVALHO, L. V.; LIMA, F. A.; QUAYLE, C.; FANTINI, M. C. A.; TANAKA, G. S.; CABRERA, W. H.; FURTADO, M. F. D.; TAMBOURGI, D. V.; MATOS, J. R.; JARONIEC, M.; SANT'ANNA, AO.Ordered mesoporous to sillica SBA-15: A new effective adjuvant to induce antibody response. **Small**, v. 2, p. 254-256, 2006.

MORA, J.R.; IWATA, M.; EKSTEEN, B.; SONG, S.Y.; JUNT, T.; SENMAN, B.; OTIPOBY, K.L.; YOKOTA, A.; TAKEUCHI, H.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAJEWSKY, K.; ADAMS, D.H.; VON ANDRIAN, U.H. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. **Science**, v. 314, p. 1157-1160, 2006.

MOYO, S. J.; GRO, N.; KIRSTI, V.; MATEE, M. I.; KITUNDU, J.; MASELLE, S. Y.; LANGELAND, N.; MYRMEL, H. Prevalence of enteropathogenic viruses and molecular characterization of group A rotavirus among children with diarrhea in Dar es Salaam Tanzania.**BMC Public. Health.**, v. 27, p. 359, 2007.

NASSER, E. A.; KAUFMANN, S. H. Improved protection by recombinant BCG. **Microbes. Infect.**, v. 7, p. 939–946, 2005.

NATARO, J. P.; STEINER, T. S.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, p. 251–261, 1998.

OCHOA, T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insight sinto the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,** p.1-5, 2008.

ORLANDI, P. P.; MAGALHÃES, G. F.; MATOS, N. B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P.A.; SILVA, L. H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil).**Braz.J. Med. Biol. Res**., v.4,p. 507-517, 2006.

PHALIPON, A.; CARDONA, A.; KRAEHENBUHL, J. P.; EDELMAN, L.; SANSONETTI, P. J.; CORTHÉSY, B. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo.**Immunity**, v. 17, n. 1, p. 107-115, 2002.

POWER, C. A.; WEI, G.; BRETSCHER, P. A. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intradermal route. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5743–50, 1998.

RAMACHANDRAN, V.; BRETT, K.; HORNITZKY, M. A.; DOWTON, M.; BETTELHEIM, K. A.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources.**J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5022-5032, 2003.

RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C. M.; MORELLI, A.; BATISTA, G. C. M. Reduced Etiological Role for Enteropathogenic *Escherichia coli* in Cases of Diarrhea in Brazilian Infants. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 398-400, 2003.

SALDANA, Z.; XICOHTENCATL-CORTES, J.; AVELINO, F. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. **Environ. Microbiol.***,* v. 11, n. 4, p. 992–1006, 2009.

SCALETSKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence ofenteropathogenic *Escherichia coli* to HeLacells. **Infect. Immun.**, v.45, n. 2, p. 534–536, 1984.

SCALETSKY, I. C.; MILANI, S. R.; TRABULSI, L. R.; TRAVASSOS, L. R.Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.56, n. 11, p. 2979–2983, 1988.

SCALETSKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; MORAIS, M. B.; CARVALHO, R.L.; SILVA, R. M.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.Association of patterns of Escherichia coli adherence to HEp-2 cells with acute and persistent diarrhea.**Arq. Gastroenterol.**, v.1, p. 54-60, 1999.

SCHRIEFER, A.; MALTEZ, J.R.; SILVA,N.; STOECKLE, M.Y.; BARRAL-NETTO,M.; RILEY, L.W. Expression of de pilin subunity BfpA of the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in a arol A live Salmonella vaccine strain. **Vaccine**,v. 17, p. 770-778, 1999.

SHALABY, W. S. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies.**Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 74, p. 127-134, 1995.

SHER, A.; FIORENTINO, D.; CASPAR, P.; PEARCE, E.; MOSMANN, T.Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection.**J. Immunol.**, v. 147, n. 8, p. 2713-2716, 1991.

SILVA, J. A.; SILVA, W. D. *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* Comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Rev. Patol. Trop.**, v.34, p. 175-196, 2005.

SINCLAIR, J. F.; DEAN-NYSTROM, E. A.; O'BRIEN, A. D. The established intimin receptor Tir and the putative eukaryotic intimin receptors nucleolin and beta 1 integrin localize at or near the site of enterohemorragic *Escherichia coli* O157:H7 adherence to enterocytes *in vivo*. **Infect Immun.,** v. 74, p. 1255-1265, 2006.

SMITH, P.L.; YEH, P.Y.; ELLENS, H. Physiological considerations in the design of particulate dosage forms for oral vaccine delivery.**Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 34, p. 123-133, 1998.

SPANO, L. C.; SADOVSKY, A. D.; SEGUI, P. N.; SAICK, K. W.; KITAGAWA, S. M.; PEREIRA, F. E.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. Age-specific prevalence of diffusely adherent Escherichia coli in Brazilian children with acute diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 3, p. 359-63, 2008.

STOVER, C. K.; DE LC, V.; FUERST, T. R.; BURLEIN, J. E.; BENSON, L.A.; BENNETT, L. T. New use of BCG for recombinant vaccines. **Nature**, v. 351, p. 456–60, 1991.

TIMM, J.; LIM, E. M.; GICQUEL, B. Escherichia coli-mycobacteria shuttle vectors for operon and gene fusions to lacZ: the pJEM series. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 6749–6753, 1994.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect.Dis**.,v. 8, p. 508–513, 2002.

ULMER, J. B.; SADOFF, J. C.; LIU, M.A. DNA vaccines**. Immunollogy,** v. 8, p. 531-536,1996.

VALLANCE AND FINLAY. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **PNAS**, v. 97, p. 8799-8806, 2000.

VANMAELE, R. P.; HEERZE, L. D.; ARMSTRONG, G. D. Role of lactosyl glycan sequences in inhibiting enteropathogenic *Escherichia coli* attachment. **Infect. Immun.**, v.67, n. 7, p. 3302–3307, 1999.

VARALDO, P. B.;LEITE, L. C.; DIAS, W. O.;MIYAJI, E. N.;TORRES, F. I.; GEBARA, V. C.; ARMÔA, G. R.; CAMPOS, A. S.; MATOS, D. C.; WINTER, N.; GICQUEL, B.; VILAR, M. M.; MCFADDEN, J.; ALMEIDA, M. S.; TENDLER, M.; MCINTOSH, D. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of

Schistossoma mansoni protects mice from Cercarial challenge. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 3336-3343, 2004.

VIDAL, J. E.; CANIZÁLEZ-ROMÁN, A.; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; NAVARRO-GARCÍA, F. Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic Escherichia coli.**Sal. Publ. Mex.**,v. 5, p. 376-386, 2007.

VOS, Q.; LEES, A.; WU, Z.Q.; SNAPPER, C.M.; MOND, J.J. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. **Immunol. Rev.**, v. 176, p. 154-170, 2000.

VUOPIO-VARKILA, J.; SCHOOLNIK, G. K. Localized adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associated with the expression of new outer membrane proteins. **J. Exp. Med.**, v. 174, n. 5, p. 1167–1177, 1991.

WIKER, H. G.; MUSTAFA, T.; BJUNE, G. A.; HARBOE, M. Evidence for waning of latency in a cohort study of tuberculosis. **BMC Infect. Dis.**, v. 10, p. 37, 2010.

WOODROW, G. C. An overview of biotechnology as applied to vaccine development**.** **New Gener. Vac.**, p. 25-34, 1997.

YADAV, M. S. R.; JEFFREY, S. Increasedmitogen-activated protein kinase activity and TNF-Production Associated with *Mycobacterium smegmatis*- but Not *Mycobacterium avium*-Infected macrophages requires prolonged stimulation of the calmodulin/calmodulin kinase and cyclic AMP/Protein Kinase A pathways.**J. Immunol.,** v.172, p.5588-5597, 2004.

YANG, H.; COOMBS, N.; OZIN, G. A. Morphogenesis of shapes and surface patterns in mesoporous silica. **Nature**, v. 386, p. 692-695, 1997.

ZHAO, D.; FENG, J.; HUO, Q.; MELOSH, N.; FREDRICKSON, G. H.; CHMELKA, B. F.; STUCKY, G. D. Triblock copolymer synthesis of mesoporoses silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. **Science**,v. 279,p. 548-552, 1998.

ZHANG, X. X.;DENG, Q.;ZHANG, S. Y.;LIU, J.;CAI, Q.;LU, Z. M.;WANG, Y.Broadly cross-reactive mimotope of hypervariable region 1 of hepatitis C virus derived from DNA shuffling and screened by phage display library.**J. Med. Virol.**, v. 71, p. 511-517, 2002.

ZHANG, H.; PENG, P.; MIAO, S.; ZHAO, Y.; MAO, F.; WANG, L.; BAI, Y.; XU, Z.; WEI, S.; SHI, C. Recombinant Mycobacterium smegmatis expressing an ESAT6-CFP10 fusion protein induces anti-mycobacterial immune responses and protects against Mycobacterium tuberculosis challenge in mice. **Scand. J. Immunol.**, v. 4,p. 349-357, 2010.

ANEXO