Rafael Ciro Marques Cavalcante

Desenvolvimento de sistemas de expressão heteróloga para

Bacillus subtilis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

Rafael Ciro Marques Cavalcante

**Desenvolvimento de sistemas de expressão heteróloga para
*Bacillus subtilis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

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

Cavalcante, Rafael Ciro Marques.

Desenvolvimento de sistemas de expressão heteróloga para *Bacillus subtilis* / Rafael Ciro Marques Cavalcante. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Uso de *Bacillus subtilis* como plataforma de expressão heteróloga.

Versão do título para o inglês: Development of heterologous expression system for *Bacillus subtilis*.

1. Produção de proteínas heterólogas 2. *Bacillus subtilis* 3. Plasmídeos 4. Sistemas de expressão heteróloga 5. *Listeria innocua* 6. Veículos vacinais vivos I. Ferreira, Prof. Dr. Luís Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0197/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rafael Ciro Marques Cavalcante.

Título da Tese: Desenvolvimento de sistemas de expressão heteróloga para
Bacillus subtilis.

Orientador(a): Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

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:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 575/13 referente ao projeto intitulado: "*Construção de sistemas de expressão para proteínas heterólogas em cepas geneticamente modificadas de Bacillus subtilis*" sob a responsabilidade de **Rafael Ciro Marques Cavalcante**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2013.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais,
Dona Amélia e Seu Barroso

Aos meus irmãos,
Diego e Raissa

A minha querida companheira,
Tonha

Muito obrigado pelo amor, dedicação, apoio e
compreensão ao longo destes anos. Sem vocês teria sido impossível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e a Nossa Senhora por me acompanharem durante todas as etapas da minha vida.

Aos meus pais, Barroso e Amélia, por todo entusiasmo, apoio e compreensão durante a longa e perene carreira que escolhi. Obrigado por incutir os verdadeiros valores da vida durante o meu amadurecimento e por me apoiarem em todas as minhas decisões, mesmo as menos acertadas.

Aos meus irmãos, Diego e Raissa, pela alegria da convivência, mesmo à distância. Obrigado por serem exemplo de dedicação, coragem e por mostrarem, de maneira carinhosa e compromissada, os meus não raros erros.

À Dona Ioneide, pela sua infindável, incomensurável e inabalável alegria capaz de transformar caminhos áridos e tortuosos em campinas verdejantes e perfumadas. Obrigado pelo privilégio de ter duas mães maravilhosas.

As minhas avós Socorro e Estelita (*in memoriam*) por serem exemplo de vida e dedicação e por mostrarem o que é o amor.

Aos tios José Marques e João Marques, exemplos de hombridade, dedicação e ética e por tornarem a escolha da minha profissão tão fácil.

Aos tios e tias Raimundo, Iracema, Chico, Bigudo obrigado pela convivência alegre e repleta de aprendizado e amor.

A minha querida Tonha, pela alegria, apoio e compreensão durante todos esses anos. Obrigado pelos já idos cinco anos de convivência repletos de carinho aprendizagem e amadurecimento. As dificuldades típicas da vida têm sido apenas leves brisas ao seu lado. Te amo!

Ao Prof. Luís Carlos, artífice de todo esse trabalho e exemplo de profissionalismo, ética e dedicação. Obrigado pela confiança depositada e pela paciência com as minhas dificuldades e percalços durante a minha formação. Sou-lhe muito grato também pelas diversas oportunidades de aprendizado e amadurecimento profissional vivenciadas durante esses oito anos de trabalho juntos. Espero, em breve, conseguir retribuir toda essa dedicação empreendida em minha formação no desenvolvimento da ciência, bem como na formação de novos pesquisadores

À Profa. Rita, pela alegria e ajuda constantes nos momentos de desânimo ou de dúvidas. Agradeço pela calorosa recepção, desde o início de minha jornada em São Paulo e pelo convívio agradável repleto de aprendizagem, tanto no campo profissional, como no amadurecimento pessoal.

I would like to thank my supervisor Darren Higgings who supported me during my fellowship at Harvard Medical School. I am very grateful for the opportunity to work with you and your team. The period at HMS was rich in learning, personal and professional growth. I also thank Kyle Perry, Daniel Grubaugh, Almaris Alonso, Jimmy Regeimbal, Elizabeth Mortiz, Professor David Rudner and Paula Llopis for their support, enthusiasm and happiness. It would have been very difficult without you guys.

À Maria Elizabete Sbrogio-Almeida, amiga de todas as horas. Obrigado por todas as lições aprendidas, por todo o seu amor, carinho e torcida que extravasam e contagiam todos a sua volta.

Aos estimados amigos, Francisco Cariri e Eduardo Gimenès, pelos momentos de descontração no laboratório e fora dele. Obrigado por me ajudarem irrestritamente, tanto nas atividades profissionais como nos intempéries pessoais. A vocês o meu forte abraço.

Aos amigos e amigas do grupo Bacillus, Wilson, Milene, Renata e Juliano (ex-bacileiro) pelo trabalho em equipe, pelas broncas e discussões acaloradas sempre recheadas de aprendizado e amadurecimento. Obrigado pela ajuda incessante nos momentos de desespero com os resultados (ou com a falta deles). O empenho e o apoio de vocês foi imprescindível para o sucesso desse trabalho. Desejo ainda as boas vindas ao neófito Adriano Prado.

À amiga Camila pelas divertidas e calorosas conversas e pelas proveitosas discussões científicas.

Aos companheiros que estiveram mais próximos de mim nos seus primeiros passos no laboratório, Ewerton, Mônica e Luana. Podem ficar certos que aprendi muito com vocês! Muito obrigado e desejo sucesso e prosperidade para vocês.

Aos companheiros de laboratório, Naína, Roberto Nepomuceno, Sara, Raíza, Rúbens, Pietro, Jaime, Marcinha, Mariana Cintra, Dalva, Amanda, André, Mariana Waligora, Juliana Falcão, Deni, Mariana Diniz, Aline Florêncio, Carolina Rivijas, Giuliana, Mira, Helic, Lenon, e Bruna. Obrigado por fazerem nosso ambiente de trabalho alegre, cheio de aprendizado.

Às funcionárias Silvia e Sabrina por todo suporte, paciência, profissionalismo e pelos momentos de descontração.

As agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro, sem o qual seria impossível realizar este trabalho.

A todos aqueles que não consegui agradecer, minha eterna gratidão.

RESUMO

CAVALVANTE, R.C.M. **Desenvolvimento de sistemas de expressão heteróloga para *Bacillus subtilis***. 2013. 132 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O principal hospedeiro para produção de proteínas heterólogas é a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*. No entanto, proteínas expressas nesse sistema frequentemente encontram-se na forma de corpúsculos de inclusão e/ou contaminadas por endotoxina, características que podem dificultar a obtenção ou o uso do produto proteico final. Bactérias gram-positivas do gênero *Bacillus* representam uma alternativa para a produção de proteínas heterólogas. As espécies desse grupo, particularmente o *B. subtilis*, são produtoras de endosporos, não possuem endotoxina e apresentam genética e fisiologia bem definidas. No entanto, um dos principais entraves para a utilização desse microrganismo como plataforma para expressão heteróloga é a baixa disponibilidade de sistemas de expressão eficientes. Nesse trabalho, desenvolvemos dois sistemas de expressão baseados em um plasmídeo de alta cópia (pFG20) e nos promotores dos genes da citidina desaminase (*cdd*), também conhecido como *P₄₃*, e do gene *gsiB* (*Glucose starvation inducible B*). A atividade dos sistemas de expressão construídos foi verificada por meio da detecção de um gene repórter, a proteína fluorescente verde (GFP). Após as análises de expressão, a condição para produção máxima do repórter foi estabelecida para os plasmídeos construídos por técnicas de luminometria e citometria de fluxo. O novo sistema também foi capaz de expressar uma proteína viral híbrida (gDE7) utilizada como modelo. Por fim, realizamos um estudo comparativo entre os plasmídeos construídos e o sistema comercialmente disponível, o pHT01. Nesses experimentos, demonstramos que os plasmídeos construídos apresentaram desempenho superior ao sistema de expressão atualmente disponível no mercado para a produção de proteínas recombinantes em *B. subtilis*. Em uma segunda parte do trabalho, avaliamos o potencial da bactéria gram-positiva *Listeria innocua* como veículo vivo de entrega para antígenos vacinais. Esses experimentos envolveram a utilização de dois antígenos modelo, a ovalbumina e uma porção da proteína P1 de *Streptococcus mutans*, principal agente etiológico da cárie humana. Após execução de ensaios *ex-vivo*, envolvendo a apresentação de antígenos, bem como a realização de imunizações em modelo murino, observou-se que linhagens recombinantes de *L. innocua* foram capazes de promover a ativação de resposta imunológica específica para os antígenos testados.

Palavras-chave: Produção de proteínas recombinantes. *Bacillus subtilis*. Plasmídeos. Sistemas de expressão heteróloga. *Listeria innocua*. Veículos vacinais vivos.

ABSTRACT

CAVALVANTE, R.C.M. **Development of heterologous expression systems for *Bacillus subtilis***. 2013. 132p. Ph.D. thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The main host for heterologous protein production is the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. However, proteins produced in this system often forms inclusion bodies and / or are contaminated by endotoxin, characteristics that may difficult the obtainment or use of the final protein product. Gram-positive bacteria of the genus *Bacillus* represent an alternative for the production of heterologous proteins. The species from this group, particularly *B. subtilis*, produce endospores, have no endotoxin and have well defined genetic and physiology. The major obstacle for the use of this microorganism as a platform for heterologous protein expression is the low availability of efficient expression systems. In this work, we developed two expression systems based on a high-copy plasmid pFG20 and promoters of cytidine deaminase (*cdd*) gene, also known as *P₄₃*, and *gsiB* gene (Glucose starvation inducible B). The activity of the constructed expression system was verified by detection of a reporter gene, the green fluorescent protein (GFP). After expression analysis, the condition for maximum production of the reporter was established for each plasmid by luminometry and flow cytometry techniques. The new system is also capable of expressing a hybrid viral protein (gDE7) which was used as a model. Finally, we conducted a comparative study between the constructed plasmids and commercially available system, the pHT01. In these experiments, we demonstrate that the constructed plasmids were superior to the expression system currently available on the market for the production of recombinant proteins in *B. subtilis*. In a second part of this work, we evaluated the potential of the gram-positive bacterium *Listeria innocua* as a live delivery vehicle for vaccine antigens. These experiments involved the use of two model antigens: ovalbumin and a portion of the P1 protein of *Streptococcus mutans*, the main etiological agent of human dental caries. After execution of *ex-vivo* assays involving antigen presentation, as well as conducting immunization in a murine model, we found that recombinant strains of *L. innocua* were able to promote the activation of specific immune response to the target antigens.

Keywords: Recombinant protein production. *Bacillus subtilis*. Plasmids. Heterologous expression systems. *Listeria innocua*. Live vaccine vehicles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Desenho esquemático dos plasmídeos utilizados como base para a construção dos novos sistemas de expressão heteróloga para <i>B.subtilis</i>	21
Figura 2- Obtenção dos promotores P_{43^*} e P_{VG} por PCR.	50
Figura 3- Análise de restrição representativa das tentativas de clonagem dos promotores P_{VG} e P_{43^*} no arcabouço dos plasmídeos derivados do pHCMC03.	51
Figura 4- Desenho esquemático dos três sistemas de expressão construídos com base no arcabouço do plasmídeo pFG20 e nos promotores P_{VG} , P_{gsiB} e P_{43^*}	54
Figura 5- Avaliação do desempenho da linhagem RL104 de <i>B.subtilis</i> albergando o plasmídeo pFGVG_GFP frente a diferentes condições de cultivo.	57
Figura 6- Avaliação do desempenho da linhagem 1012 de <i>B.subtilis</i> albergando o plasmídeo pFGgsiB_GFP frente a diferentes condições de cultivo.	59
Figura 7- Avaliação do desempenho da linhagem 1012 de <i>B.subtilis</i> albergando o plasmídeo pFG43_GFP frente a diferentes condições de cultivo	61
Figura 8- Desenho esquemático dos dois plasmídeos utilizados como controle para expressão de GFP	63
Figura 9- Avaliação do desempenho da linhagem 1012 de <i>B.subtilis</i> albergando o plasmídeo pHCMC02_GFP frente a diferentes condições de cultivo.	64
Figura 10- Avaliação do desempenho da linhagem 1012 de <i>B.subtilis</i> albergando o plasmídeo pHT01_GFP frente a diferentes condições de cultivo.	66
Figura 11- Análise comparativa do desempenho dos sistemas de expressão empregados após quatro horas de crescimento.	67
Figura 12- Influência do cultivo por uma noite (16 horas) no desempenho dos sistemas de expressão testados	69
Figura 13- Análise por citometria de fluxo do desempenho dos plasmídeos construídos frente ao vetor comercial pHT01 após 16 horas de cultivo.	71

Figura 14- Influência da pressão seletiva (antibiótico) no desempenho do sistema de expressão pFGgsiB após 16 horas de cultivo.....	74
Figura 15- Influência da pressão seletiva (antibiótico) no desempenho do sistema de expressão pFG43 após 16 horas de cultivo.	75
Figura 16- Efeito do arcabouço plasmidial no desempenho do promotor P_{gsiB}	77
Figura 17- Análise em microscopia de fluorescência das linhagens de <i>B.subtilis</i> albergando plasmídeos derivados do pHCMC03.....	80
Figura 18- Análise em microscopia de fluorescência das linhagens de <i>B.subtilis</i> albergandopasmídeos derivados do pFG20.	81
Figura 19- Avaliação da produção de GFP pelos sistemas de expressão construídos emSDS-PAGE.	83
Figura 20- Construção de linhagens de <i>B.subtilis</i> capazes de produzir a proteína híbrida gDE7.	85
Figura 21- Sistema de expressão envolvendo o promotor P_{mrgA} nativo e o plasmídeo derivado do pHCMC03.....	87
Figura 22- Esquema ilustrativo da construção da versão modificada do promotor P_{mrgA}	89
Figura 23- Desenho esquemático dos plasmídeos utilizados para expressão do antígeno modelo ovalbumina em <i>B.subtilis</i> e <i>L.innocua</i>	91
Figura 24- Análise de expressão in vitro de linhagens de <i>B.subtilis</i> e <i>L.innocua</i> albergando os plasmídeos pAM401_OVA ou pAM401_AK2t_cytoLLO_OVA.	92
Figura 25- Análise da capacidade de veiculação de antígenos pelas linhagens de <i>L.innocua</i> em ensaio com células B3Z.....	94
Figura 26- Construção de linhagens de <i>B.subtilis</i> e <i>L.innocua</i> capazes de produzir a proteína SBR.	95
Figura 27- Avaliação da resposta imunológica específica induzida após as imunizações com linhagens recombinantes de <i>L.innocua</i> e <i>B.subtilis</i> capazes de produzir a proteína SBR.....	97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Iniciadores utilizados durante o trabalho.....	46
Quadro 2- Linhagens bacterianas utilizadas durante o trabalho.....	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Sistemas de expressão heteróloga para <i>B.subtilis</i>	16
1.2 Potencial de <i>Listeria innocua</i> como veículo de entrega para antígenos heterólogos	25
2 OBJETIVOS	30
2.1 Geral	30
2.2 Específicos	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Condições de cultivo bacterianas	31
3.2 Obtenção das sequências promotoras	31
3.3. Clonagem dos promotores P_{43} e P_{VG} no cerne de derivados do pHCMC03	33
3.4 Construção dos plasmídeos da série pFG20	34
3.5 Construção de plasmídeos que codificam para a proteína verde fluorescente	34
3.6 Construção do plasmídeo pFGgsiB_gDE7	35
3.7 Competência e transformação em <i>E. coli</i>	36
3.8 Competência e transformação em <i>B. subtilis</i>	37
3.9 Técnicas de Biologia Molecular	37
3.10 Detecção da produção de GFP por luminometria	38
3.11 Detecção da produção de GFP por citometria de fluxo	39
3.12 Observação das linhagens de <i>B.subtilis</i> produtoras de GFP por microscopia ótica	39
3.13 Plasmídeos para expressão heteróloga em <i>L.innocua</i> e <i>B.subtilis</i>	39
3.14 Competência e transformação em <i>L.innocua</i>	41
3.15 Preparação das linhagens recombinantes de <i>B.subtilis</i> e <i>L.innocua</i> para realização de ensaios com as células B3Z e para detecção de expressão <i>in vitro</i>	41
3.16 SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	42
3.17 Ensaios com células B3Z	42

3.18 Ensaio de imunização e coleta de material para as análises de resposta imune.	43
3.19 Detecção de anticorpos IgG específicos para proteína SBR	44
3.20 Detecção de linfócitos T CD4 ⁺ e TCD8 ⁺ específicos produtores de INF- γ	44
3.21 Análises estatísticas	45
4 RESULTADOS	49
4.1 Construção de sistemas de expressão para <i>B.subtilis</i>	49
4.2 Avaliação do potencial de <i>L.innocua</i> como veículo de entrega para antígenos heterólogos	90
5 DISCUSSÃO FINAL.....	98
6 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS	108
APÊNDICE - Atividades acadêmicas desenvolvidas durante o período de doutorado	125

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistemas de expressão heteróloga para *B.subtilis*

O mercado mundial de produção de proteínas recombinantes vem crescendo vertiginosamente, perfazendo hoje cerca de 50 - 60 bilhões de dólares ano (HUANG et al., 2010; KOEHN; HUNT, 2009). A *Escherichia coli* é o principal hospedeiro procariótico utilizado para essa finalidade. O baixo custo de cultivo, o vasto conhecimento acerca de sua genética e fisiologia, bem como a disponibilidade de diversos sistemas de expressão para essa bactéria estão entre os principais fatores que justificam essa posição de destaque (CHEN, 2012; SAMUELSON, 2011; TERPE, 2006; YIN et al., 2007). De fato, a maioria das proteínas recombinantes utilizada em pesquisa científica e em aplicações farmacológicas advém desse microrganismo. Produtos como a insulina humana, o hormônio do crescimento, o fator VIII da coagulação são alguns exemplos da gama de produtos obtidos a partir de linhagens recombinantes dessa bactéria.

Apesar do grande sucesso no emprego de linhagens recombinantes de *E.coli* como plataforma de expressão heteróloga, alguns entraves ainda encarecem o produto final, bem como podem impedir a obtenção da proteína recombinante em sua conformação nativa. A *E.coli* possui uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS), substância conhecida como endotoxina ou pirógeno, capaz de desencadear febre exacerbada e marcante resposta inflamatória, podendo levar à morte quando inoculada em hospedeiro mamífero (MORRISON et al., 1999; PABST; JOHNSTON, 1989). O uso laboratorial de proteínas recombinantes também pode ser prejudicado pela presença deste constituinte, principalmente em ensaios que envolvam células imunológicas ou quando o produto recombinante destina-se ao desenvolvimento de vacinas. Dessa forma, produtos proteicos produzidos a partir dessa bactéria necessitam de uma etapa adicional de remoção dessa substância, o que aumenta o custo de produção e suscita risco potencial (MAGALHÃES et al., 2007). A *E.coli* não possui grande capacidade de secreção proteica, o que resulta em acúmulo da proteína de interesse no citoplasma ou no periplasma. Dessa forma, há um custo adicional intrínseco ao processo de ruptura celular. Além disso, o citoplasma é um compartimento celular extremamente redutor. Essa última característica dificulta

dobramento correto de algumas proteínas, implicando etapas de *refolding*, processo que almeja restabelecer a estrutura conformacional nativa de uma proteína. Outra dificuldade bastante comum na expressão heteróloga em *E.coli* é a formação de agregados insolúveis, denominados de corpúsculos de inclusão (BANEYX; MUJACIC, 2004; FAHNERT; LILE; NEUBAUER, 2004; KANE; HARTLEY, 1998). A obtenção de proteínas solúveis desses corpúsculos exige a utilização de agentes desnaturantes, bem como etapas de *refolding*. Essas etapas adicionais costumam ser demoradas, frequentemente levam a perda considerável do produto final e, por fim, não garantem que a conformação nativa da proteína tenha sido restabelecida.

Bacillus subtilis surge como uma alternativa ao uso de *E.coli* como plataforma para expressão de proteínas heterólogas. Trata-se de um bacilo gram-positivo encontrado principalmente no solo e, assim como a *E.coli*, multiplica-se em meios simples e baratos, atingindo densidades celulares altas em um curto espaço de tempo. Além disso, é o microrganismo utilizado como modelo de estudo de bactérias gram-positivas, o que resultou na construção de um legado acerca de sua genética e fisiologia só comparáveis aos estudos com *E.coli* (EARL; LOSICK; KOLTER, 2008; FERREIRA, FERREIRA; SCHUMANN, 2005; HARWOOD, 1992). *B.subtilis* possui naturalmente uma grande capacidade de secreção de proteínas, característica que pode ser prontamente aproveitada para obtenção de proteínas heterólogas diretamente sobrenadante de cultura (HARWOOD; CRANENBURGH, 2008; POHL; HARWOOD, 2010; VAN DIJL; HECKER, 2013). A purificação, a partir dessa fração da cultura, é menos onerosa, mais rápida e eficiente, uma vez que dispensa a lise celular e, por conseguinte, evita a liberação do conteúdo citoplasmático o qual está repleto de proteínas do hospedeiro.

A formação de endosporos e a ausência de endotoxina são outras peculiaridades de algumas bactérias gram-positivas, tais como o *B.subtilis*. Os endósporos são as estruturas vivas mais resistentes do planeta e podem ser armazenados à temperatura ambiente por muitos anos. Essa característica reduz os gastos com a refrigeração das bactérias recombinantes produzidas, além de permitir a estocagem por longos períodos sem a necessidade de repiques sucessivos. A ausência de endotoxina, como já foi citada, dispensa etapas adicionais de purificação necessárias à remoção desse subproduto, reduzindo custos e aumentando a segurança do uso de proteínas recombinantes advindas desse microrganismo.

B.subtilis apresenta utilização de códons bastante diversa, mesmo quando comparado à *E.coli* (SCHUMANN, 2007; SHARP et al., 1988). Essa característica contribui para expressão de genes heterólogos, uma vez que a presença de códons raros para uma dada espécie pode reduzir ou até impedir a obtenção do produto recombinante final. Outro ponto relevante, é que há pouquíssimos relatos onde a expressão heteróloga ocorre na forma de corpúsculos de inclusão em *B.subtilis* (AIRAKSINEN et al., 2003; CHEN et al., 2010; IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ et al., 1995, 1996; NURMINEN et al., 1992). Como já foi mencionada, a expressão heteróloga na forma solúvel dispensa as etapas dispendiosas relativas ao tratamento de corpúsculos de inclusão e contribui para redução das perdas durante o processo de purificação.

Apesar da série de vantagens apresentada acima, alguns entraves impedem o emprego massivo de *B.subtilis* como plataforma para expressão de proteínas heterólogas. Dentre essas limitações, destacam-se: a) secreção abundante de proteases que podem degradar a proteína de interesse; b) instabilidade plasmidial e c) existência de poucos plasmídeos para expressão heteróloga (BOLHUIS et al., 1999; LI et al., 2004; WESTERS; WESTERS; QUAX, 2004).

Diversos estudos já produziram linhagens de *B.subtilis* deficientes em proteases, tais como, WB600, WB700 e WB800, as quais apresentam deleções em respectivamente seis, sete ou oito das principais proteases de *B.subtilis*. (MURASHIMA et al., 2002; WU et al., 1991; YE; YANG; WONG, 1999). A linhagem WB800 apresenta atividade proteolítica residual de menos de 0,20%, quando comparada à cepa selvagem *B.subtilis* 1012. Apesar da existência desse residual de atividade proteásica, a construção dessas linhagens tem contribuído bastante no desenvolvimento de *B.subtilis* como plataforma para expressão de proteínas heterólogas (DAI et al., 2009; LU et al., 2010; NGUYEN; QUYEN; LE, 2013; PHUONG et al., 2012). Como foi mencionado acima, *B.subtilis* apresenta um eficiente aparato secretor. Essa característica pode diminuir as chances de dobramento incorreto da proteína heteróloga, pois esta pode ser rapidamente secretada para o meio evitando a permanência no ambiente redutor do citoplasma.

Os plasmídeos de bactérias gram-positivas podem ser divididos em dois grandes grupos com base no modo de duplicação. O primeiro grupo, denominado de plasmídeos com tipo de replicação círculo rolante, responde pela maioria dos plasmídeos isolados de bactérias gram-positivas. Em geral, são plasmídeos de pequeno tamanho (< 10Kb) e

possuem número de cópias por célula bastante variável. Os principais plasmídeos dessa classe utilizados na construção de bactérias gram-positivas recombinantes são: pT181, pUB110, pC194 e pLS1 (GRUSS; EHRLICH, 1989; JANNIERE; GRUSS; EHRLICH, 1993; NOVICK, 1989). A duplicação pelo mecanismo círculo rolante leva à formação intermediários de DNA de fita simples. Essas estruturas são mais suscetíveis a recombinações intermoleculares e frequentemente resultam em perda da informação genética codificadas por esses plasmídeos (instabilidade estrutural) (BRON et al., 1991; EHRICH et al., 1986;1991;MEIJER et al., 1995).

A instabilidade estrutural dos plasmídeos com duplicação tipo círculorolante tem desencorajado seu uso em estratégias de expressão heteróloga em bactérias gram-positivas. Em *B.subtilis*, apenas os derivados do plasmídeo pUB110 (KEGGINS; LOVETT; DUVALL, 1978) oriundo de *Staphylococcus aureus*, ainda são empregados em novas estratégias para expressão heteróloga (SERRANO-HERAS; SALAS; BRAVO, 2005; WENZEL et al., 2011; WU; WONG, 1999). Uma alternativa à instabilidade genética é a utilização de sistemas integrativos. Nestes últimos, um plasmídeo medeia a inserção da unidade de expressão no DNA genômico bacteriano. Essa abordagem permite maior estabilidade uma vez que a informação heteróloga é duplicada junto ao DNA genômico bacteriano, entretanto acarreta menores quantidades proteínas recombinantes em função da redução no número de cópias gênicas (CHEN et al., 2010; JAN et al., 2001;MOGK; HAYWARD; SCHUMANN,1996).

O segundo grupo de plasmídeos caracteriza-se pela duplicação do tipo teta (θ). Essa alcunha remete-se a estruturas no formato da referida letra grega observadas durante a duplicação. Esse mecanismo é mais encontrado em plasmídeos oriundos de bactérias gram-negativas e apenas poucos representantes foram isolados de gram-positivas. Esses plasmídeos possuem tamanho bastante superior aos encontrados em plasmídeos com replicação círculo rolante, podendo alcançar até 90 Kb, ao passo que o número de cópias por célula pode variar da cópia única até mais de 100 plasmídeos por célula (TANAKA et al., 1977;TITOK et al., 2003; UOZUMI et al., 1980).A replicação do tipo teta não passa por intermediários de DNA de fita simples, principal fator apontado para instabilidade de plasmídeos de replicação tipo círculo rolante.De fato, vários estudos tem mostrado alta estabilidade plasmídeos com replicação do tipo teta frente aos que se duplicam por mecanismo círculo rolante (LAGODICH et al., 2004; NGUYEN et al., 2005; TITOK et al., 2003; XIA et al., 2007).

Dentre os plasmídeos de replicação do teta capazes de propagarem-se em *B.subtilis*, destacam-se os derivados do pAM β 1 e do pBS72. O pAM β 1 foi isolado inicialmente *Enterococcus faecalis*, demonstra alto número de cópias (50-100) em *B.subtilis*, apresenta replicação unidirecional e possui marcante estabilidade estrutural e segregacional (BRUAND et al., 1993; BRUAND; EHRLICH, 1998; CLEWELL et al., 1974; OULTRAM et al., 1988). O pBS72 foi obtido de isolados de *B.subtilis* da Bielorrússia, possui número intermediário de cópias por célula (5-10), apresenta duplicação bidirecional e também é dotado de alta estabilidade (NGUYEN et al., 2005; TITOK et al., 2003). Uma vez que as transformações bacterianas ocorrem com maior eficiência em *E.coli*, algumas versões desses plasmídeos, capazes de duplicarem-se tanto em *B.subtilis* como em *E.coli*, foram construídas (vetores bifuncionais). Desse modo, o pHCMC e o pMTL500E são versões bifuncionais dos plasmídeos pBS72 e pAM β 1, respectivamente (NUYGEN, et al., 2005; OULTRAM et al., 1988). A figura 1 contempla o pFG20, derivado do pMTL500E, e o pHCMC03, que advém do pHCMC.

Figura 1- Desenho esquemático dos plasmídeos utilizados como base para a construção dos novos sistemas de expressão heteróloga para *B.subtilis*.

(A) pFG20: Destaques para as regiões RepE, responsável pela replicação do plasmídeo em *B.subtilis*, e para as indicações Amp e Tet as quais indicam, respectivamente, os genes para resistência à ampicilina em bactérias gram-negativas e à tetraciclina em bactérias gram-positivas.(B) pHCMC03: Destaques para as regiões RepA, responsável pela replicação do plasmídeo em *B.subtilis*, e para as indicações Amp e Cm, as quais representam, respectivamente, os genes para resistência à ampicilina, em bactérias gram-negativas, e, ao cloranfenicol em bactérias gram-positivas. Alguns sítios de restrição presentes nos plasmídeos encontram-se destacados nos desenhos e os sítios múltiplos de clonagem (MCS) estão indicados à esquerda das regiões promotoras de cada plasmídeo.

A eficiência de um sistema de expressão heteróloga não se resume à estabilidade e ao número de cópias gênicas. Promotores ditos fortes, capazes de dirigir a transcrição eficiente de genes heterólogos, são constituintes indispensáveis para a alta produção heteróloga (HERAVI; WENZEL; ALTENBUCHNER, 2011; PHAN; NUYGEN; SCHUMANN, 2012).O promotor do gene *gsiB*(*glucose starvation inducible*)é derivado de *B.subtilis* e tem sua atividade regida pelo fator sigma alternativo B (σ^B). Esse promotor demonstra uma baixa expressão em condições de crescimento exponencial (fase Log). No entanto, sua atividade é marcadamente induzida na presença de estresses ambientais, tais como escassez de glicose, altas temperaturas, alterações de pH e adição de sais ou etanol (MAUL et al., 1995; NGUYEN et al., 2005; VÖLKER et al., 1994,1995).

O promotor P_{43} fora inicialmente descrito por Wang e Doi (1984) e possui regiões para reconhecimento para os fatores sigmas A e B. Em 1989, Song e Neuhard identificaram o gene controlado pelo promotor P_{43} como *cdd* (*citidine deaminase gene*), gene responsável

pela síntese da enzima citidina desaminase. Esse promotor é descrito como forte, quando comparado a outros promotores de *B. subtilis* comumente utilizados para expressão heteróloga, tais como P_{sacB} (induzível por sacarose) ou P_{amyE} (promotor da alfa amilase) (GAT et al., 2003; YE et al., 1999).

O promotor do gene *spoVG* (P_{VG}) é ativado principalmente no início da fase estacionária e está envolvido no controle geral da esporulação em *B. subtilis*. O promotor P_{VG} está sob regulação do fator sigma H (*spoOA* ou σ^H) e do já citado sigma B. O σ^H regula a expressão de genes ligados à entrada na fase estacionária e à indução de competência, (HALDENWANG, 1995; ZUBER et al., 1987). Em linhagens selvagens, o P_{VG} possui atividade basal durante a fase logarítmica de crescimento e há um aumento substancial de sua atividade a partir da entrada na fase estacionária (JOHNSON; MORAN; LOSICK, 1989). No entanto, há duas linhagens recombinantes de *B. subtilis* capazes de produzir σ^H a partir da adição de IPTG. Nessas linhagens, portanto, a atividade do promotor P_{VG} é induzida a partir da adição de IPTG. A linhagem RL104 possui uma cópia do gene *spoOA* (σ^H) integrada ao cromossomo sob o controle do promotor P_{spac} (BRITTON et al., 2002; JAACKS et al., 1989) e a linhagem RL322 possui esse mesmo gene à jusante de uma versão modificada e mais eficiente do P_{spac} , conhecido como $P_{hyper-spank}$ (MÜLLER; OEHLER; MÜLLER, 1996).

O promotor do gene *mrgA* (*metal regulated gene A*) de *B. subtilis* é induzido na carência de metais divalentes, estresse oxidativo ou entrada na fase estacionária (CHEN; JAMES; HELMANN, 1993; FUANGTHONG et al., 2002). A regulação desse promotor é mediada por uma proteína denominada de Per, a qual na presença de metais divalentes, principalmente o ferro, liga-se a porção operadora do promotor e inibe a transcrição (FUANGTHONG; HELMANN, 2003). Em trabalho recente, demonstrou-se marcante atividade de uma versão modificada desse promotor nas bactérias gram-negativas *E. coli* e *Cupriavidus metallidurans* (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010). As alterações na sequência natural propostas pelo referido trabalho localizam-se apenas entre região de ligação do ribossomo (RBS - *Ribosome Binding Site*) e o códon de iniciação. O potencial desse promotor em sistemas de expressão para *B. subtilis* ainda não foi explorado.

Como foi exposto, promotores fortes e plasmídeos de múltiplas cópias estáveis figuram entre os principais componentes dos sistemas de expressão eficientes. No entanto, eventos pós-transcricionais também são capazes de interferir no montante final de produto heterólogo produzido. Entre esses últimos fatores, destacam-se as regiões estabilizadoras de

RNA_m e as sequências de Shine Dalgarno (SD) fortes. As primeiras aumentam a vida média do transcrito, permitindo maior disponibilidade para tradução, ao passo que SD fortes aumentam a estabilidade da ligação com o ribossomo, culminando com maior eficiência de tradução. Em *B. subtilis*, os dois casos mais documentados de sequências estabilizadoras de RNA_m ocorrem nos genes da serina protease alcalina (*aprE*) e do já comentado, *gsiB*. No transcrito do gene *aprE*, a formação de estrutura secundária de RNA_m (*stem-loop*) e a manutenção do RBS nativo são implicados como principais fatores responsáveis pela vida média prolongada desse transcrito (HAMBRAEUS; KARHUMAA; RUTBERG, 2001). A estabilidade do RNA_m derivado do *gsiB* advém da presença de um RBS forte, de modo que a substituição ou alteração pontual dessa sequência leva à diminuição drástica da vida média do transcrito (JURGEN; SCHWEDER; HECKER, 1998). Dessa forma, a utilização dessas sequências junto a diferentes promotores pode levar ao aumento de desempenho de sistemas de expressão heteróloga em *B. subtilis*.

Apesar das vantagens inerentes à utilização de *B. subtilis* como plataforma de expressão heteróloga, bem como dos diferentes plasmídeos e promotores eficientes disponíveis, há somente um sistema de expressão heteróloga comercialmente disponível para esse hospedeiro. Os derivados do pHT01 compreendem uma série de seis plasmídeos que se distinguem pela adição de diferentes sequências utilizadas para purificação por cromatografia de afinidade (*tags*) ou pela presença de peptídeos sinais para secreção (NGUYEN; PHAN; SCHUMANN, 2007; MoBiTec GmbH, Germany 2008). Esses vetores são derivados do pHCMC03 (Figura 1B) e, por isso, partilham a replicação do tipo teta e o número intermediário de cópias por célula. Nesses plasmídeos, a expressão dos genes heterólogos é dirigida pelo promotor híbrido induzível P_{grac} , o qual é composto pela região promotora do gene GroES/GroEL de *B. subtilis* e pelo operador do gene *lac* de *E. coli*. O vetor também encerra o gene *lacI* responsável pela inibição do P_{grac} na ausência de lactose ou seus análogos sintéticos.

Esse sistema mostrou-se eficiente na produção de diferentes proteínas heterólogas em *B. subtilis* (BIVER et al., 2013; HEMBERGER et al., 2011; HESS et al., 2013; ILK et al., 2011; TAVARES et al., 2010). No entanto, em trabalho desenvolvido pelo nosso grupo, esse sistema não foi capaz de dirigir a expressão dos genes virais da proteína E7 do vírus do papiloma humano tipo 16 (HPV-16) e da glicoproteína D do vírus do Herpes tipo I (CAVALCANTE, 2008). Além disso, a utilização desse sistema em nosso laboratório tem

apresentado alguns problemas, tais como a falha na expressão de algumas proteínas de bactérias gram-negativas e a perda da expressão do gene alvo após curto período de estocagem (dados não publicados).

A primeira parte desse trabalho contempla a construção de novos sistemas de expressão heteróloga para *B.subtilis*. Para tal feito, foram empregados dois arcabouços plasmidiais e três regiões promotoras. Os vetores empregados são derivados dos plasmídeos pAM β 1 (pFG20) e pBS72 (pHCMC03), duplicam-se por replicação do tipo teta e demonstram marcante estabilidade estrutural e segregacional. Os promotores utilizados foram o P_{gsiB} , o P_{VG} e uma versão modificada do promotor P_{43} . Esse último conta com a SD do promotor P_{gsiB} , o qual é idêntico ao consenso para *B.subtilis* e, como já foi citado, contribui para estabilidade do RNAm. Espera-se que os sistemas de expressão descritos nesse trabalho contribuam para o aprimoramento de *B.subtilis* como plataforma de expressão heteróloga e permitam o seu uso como alternativa aos sistemas baseados em *E.coli* na produção de proteínas recombinantes.

1.2 Potencial de *Listeria innocua* como veículo de entrega para antígenos heterólogos

Assim como o *B.subtilis*, *L.innocua* é um bacilo gram-positivo, móvel, ubiquitário, anaeróbio facultativo e não patogênico. É um microrganismo saprófito e é frequentemente isolado em vegetais, solo, água, carnes, frutos do mar, laticínios e animais. Não formam cápsulas nem são capazes de gerar endosporos. Provavelmente devido ao seu habitat natural, esse procarioto é metabolicamente versátil. Multiplica-se em uma ampla faixa de temperatura que pode variar entre 0 °C e 45°C, tolera concentrações salinas de até 10% e consegue manter o crescimento em diferentes pH (4,5-9,0) (GRAU; VANDERLINDE, 1990). O gênero *Listeria* pertence filo dos Firmicutes e é composto, além da *L.innocua*, pelas espécies *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* (BOERLIN et al., 1992; GRAVES et al., 2009). De todas essas espécies, somente as duas últimas são consideradas patogênicas, causando uma doença denominada genericamente de listeriose. A *L. ivanovii* acomete normalmente bovinos, caprinos e ovinos, ao passo que a *L. monocytogenes* pode ocasionar a doença tanto em animais quanto em humanos.

A listeriose é uma infecção alimentar causada principalmente pela ingestão de frutas, legumes, laticínios ou carnes contaminadas e, embora adultos jovens sejam afetados, possui maior incidência entre crianças, idosos, gestantes e imunodeprimidos. A incidência da doença é baixa, cerca de 2 a 8 casos por 1.000.000 habitantes na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA) (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). A maioria dos casos observados em humanos ocorre na forma de surto, como por exemplo, os observados pela ingestão de melões contaminados em setembro de 2011 e pela ingestão de queijos tipo ricota em 2012, ambos nos EUA. Na América do Sul, a incidência é ainda menor e ocorre prioritariamente nos grupos de risco. Recentemente, em maio desse ano, ocorreu um surto da doença no Chile, após a ingestão de queijo tipo *camembert* contaminado. Apesar da baixa incidência na população mundial, a listeriose possui mortalidade alta, que varia entre 20% e 30% (FARBER; PETERKIN 1991; GOULET; BROHIER, 1989; ROCOURT; REILLY, 2000; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). No surto que ocorreu no Chile, por exemplo, 34 pessoas foram afetadas e pelo menos cinco morreram decorrente da infecção.

A infecção normalmente inicia-se a partir da ingestão do patógeno e da adesão e invasão do epitélio intestinal. As duas últimas etapas são mediados pela presença de

diferentes proteínas associadas à parede celular, principalmente as invasinas A e B (InIA, InIB) (GAILLARD et al., 1991; LECUIT et al., 1997 e 1999). No interior dos enterócitos, a *L.monocytogenes* é capaz de evadir-se do fagolisossomo, devido principalmente à secreção de sua citolisina denominada listeriolisina (LLO) e da fosfolipase C inositol específica PclA. Ao ganhar o citoplasma, vários fatores de virulência controlados pelo regulador global de patogenicidade *prfA* permitem a sobrevivência da bactéria nesse sítio (DE LAS HERAS et al., 2011; SCORTTI et al., 2007). A disseminação da bactéria ocorre célula a célula, por meio da reorganização de filamentos de actina que são capazes de propelir o patógeno de uma célula para outra. Essa etapa é mediada principalmente pela proteína ActA, responsável pela alteração na dinâmica de actina, e pela fosfolipase C fosfatidilcolina específica (PclB), a qual facilita a dissolução das membranas biológicas após a propulsão do patógeno célula a célula (PORTNOY et al., 1992; SECHI; SMALL; WEHLAND, 1997; THERIOT et al., 1992;). Dentro da célula recém-infectada, a bactéria escapa novamente do fagolisossomo e o processo se repete, culminando com a propagação do patógeno pelo organismo. Além dos enterócitos, *L.monocytogenes* é capaz de invadir e se multiplicar no citoplasma de diferentes células, tais como hepatócitos, células dendríticas, fibroblastos, esplenócitos, células de Kupfer, neurônios e células da micróglia (DRAMSI et al., 1995 e 1998; DREVETS et al., 1995; GUZMAN et al., 1995; KOLB-MAURER et al., 1995; KUHN; KATHARIOU; GOEBEL, 1988; WOOD; MAROUSHEK; CZUPRINSKI, 1993). A invasão de tipos celulares diversos, a capacidade de cruzar as barreiras intestinais, hematoencefálica e placentária, somadas à replicação intracelular podem levar a diferentes quadros patológicos. Entre eles destacam-se, septicemia, meningite, encefalites, lesões no fígado e no baço e abortos. A gravidade das infecções causadas por esse microrganismo torna-o digno de atenção pelas autoridades de saúde pública, sobretudo no tocante ao controle da contaminação de alimentos, sua principal via de infecção.

As espécies *L.innocua* e *L.monocytogenes* são bastante semelhantes, principalmente no que concerne aos seus habitats e genomas (BOU-M'HANDI et al., 2007; GLASER et al., 2001; SAUDERS et al., 2006, 2012). De fato, a bactéria patogênica sequenciada (EGD-e) possui 270 genes exclusivos, ao passo que *L.innocua* (CLIP11262) encerra apenas 149 genes particulares. As principais diferenças entre as espécies residem no fato de que a espécie patogênica alberga uma ilha de patogenicidade de aproximadamente 10 kb, denominada de *vgc* (*virulence gene cluster*), além de regiões que codificam para diferentes invasinas e genes

relacionados à sobrevivência intracelular (GLASER et al., 2001). O *vgc* contempla os genes *hly*, *actA*, *prfA*, *plcA*, *plcB* e *mpl*. Os cinco primeiros genes codificam respectivamente para as já aludidas proteínas listeriolisina O, ActA, para o regulador global de virulência e para as fosfolipases C PclA e PclB. O gene *mpl* codifica para uma metaloprotease que atua convertendo a PclB a sua forma metabolicamente ativa. A *L.innocua* CLIP1162 carece de tais genes e contempla um plasmídeo de 80 kb. Esse último codifica para óperons ligados à resistência e ao metabolismo de metais pesados.

Devido à similaridade entre as duas espécies, *aL.innocua* vem sendo utilizada como substituta da linhagem patogênica na indústria alimentícia, principalmente em testes de validação de métodos físicos e químicos de controle microbiano (FRIEDLY et al., 2008; GUO et al., 2013; SOMMERS et al., 2009). A medida se justifica pelo risco associado à utilização de culturas com alto título de *L.monocytogenes* nestes ensaios. Apesar de não patogênica, a presença de *L.innocua* em alimentos pode levar a diminuição do tempo de prateleira de produtos congelados, devido principalmente à capacidade de multiplicar-se a baixas temperaturas. Outro emprego comum é a utilização de *L.innocua* em estudos que visam à elucidação de mecanismos de patogenicidade da *L.monocytogenes*, uma vez que as duas espécies são as mais próximas entre si dentro de todo gênero (SCHMID et al., 2005; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Alguns trabalhos já tentaram empregar isolados de *L.innocua* como estratégia vacinal para infecções por *L.monocytogenes* (KEARNS; HINRICHS, 1977; KOENIG et al., 1983). Nesses estudos, múltiplas doses de 10^{12} bactérias foram administradas e a proteção parcial em modelo murino foi atingida. No entanto, a imunidade gerada foi efêmera e, por esse motivo, o uso dessas linhagens com apelo vacinal foi relegado a segundo plano. Recentemente, em uma estratégia inovadora, Mohamed e colaboradores (2012) construíram uma linhagem recombinante de *L.innocua* a partir da inserção da ilha de patogenicidade *vgc* de *L.monocytogenes*. A administração desta bactéria recombinante como estratégia vacinal levou à proteção total de camundongos frente à infecção com a espécie patogênica, bem como a geração de memória imunológica. Além disso, demonstrou-se que a linhagem não patogênica geneticamente modificada não causou danos extensos aos animais, sendo, portanto, considerada segura pelo estudo. À exceção dos trabalhos que visam o desenvolvimento de vacinas voltadas à *L.monocytogenes*, não há registros do emprego de *L.innocua* como veículo vivo de entrega de antígenos vacinais.

O emprego de procariotos como veículos de entrega de antígenos vacinais apresenta várias vantagens. As estruturas exclusivas dos microrganismos denominadas padrões moleculares associados a patógenos PAMP (*Pathogen-associated molecular patterns*), como por exemplo, ilhas de CpG, flagelina ou constituintes da parede celular, são capazes de ativar componentes da resposta imune inata e potencializar a resposta imunológica frente aos antígenos vacinais (CURTISS, 2002). Essas propriedades diminuem a necessidade de utilizar outros adjuvantes e podem reduzir a quantidade de doses e de antígenos necessários, fatores que contribuem para redução dos custos e efeitos adversos das formulações vacinais. Uma vez que os antígenos-alvo encontram-se protegidos no interior dos veículos vacinais, essa estratégia permite a administração por via de mucosa. Além de não necessitar de pessoal especializado, a utilização dessa via de administração permite a geração de resposta imune local e sistêmica (LAVELLE; O'HAGAN, 2006; NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006). Dessa forma, a administração pelas vias de mucosa aumenta o potencial de uma vacina, principalmente devido às mucosas serem a principal via de entrada para patógenos.

As bactérias empregadas como veículos vacinais podem ser divididas em dois grandes grupos, as não patogênicas e as patogênicas atenuadas. As não patogênicas possuem a vantagem de apresentar mais segurança, pois não há o risco potencial de reversão de patogenicidade. As atenuadas demonstram, em geral, maior imunogenicidade e eficiência terapêutica. Essas características estão ligadas principalmente à preservação de alguns fatores de patogenicidade que frequentemente atuam como adjuvantes, potencializando a resposta imunológica frente aos antígenos carregados. Entre os organismos não patogênicos destacam-se o emprego das bactérias lácteas (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus gordonii*) e de *B. subtilis* tanto na forma de células vegetativas como de esporos (AMUGUNI; TZIPORI, 2012; LUIZ et al., 2008; PACCEZ et al., 2007; PERMPOONPATTANA et al., 2011; WELLS, 2011). As bactérias atenuadas mais empregadas em estratégias vacinais incluem *Salmonella* e *L. monocytogenes*. Os estudos com essas duas bactérias incluem inclusive promissoras estratégias já em ensaios clínicos contra alguns tipos de câncer (CHOROBK et al., 2013; SINGH; WALLECHA, 2011). Devido ao aumento de imunodeficientes, principalmente associado a patologias como a AIDS ou ao uso de medicamentos imunossupressores o desenvolvimento de estratégias vacinais envolvendo o menor risco possível tem sido encorajado (CURTISS, 2002).

Na segunda parte desse trabalho, propôs-se a utilização da bactéria não patogênica *L.innocua* como veículo de entrega para antígenos heterólogos. Como lembrado acima, a utilização vacinal dessa linhagem restringia-se ao desenvolvimento de vacinas contra a listeriose. Para tal feito utilizamos dois antígenos modelo, a ovalbumina e um polipeptídeo derivado da proteína P1 de *Streptococcus mutans*. A ovalbumina é o antígeno modelo mais utilizado em ensaios imunológicos e a proteína P1 é o principal antígeno de *S.mutans* utilizado em estratégias vacinais contra a cárie dental humana.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Desenvolver sistemas de expressão heteróloga epissomais para *B. subtilis* capazes de promover a produção de altos níveis de proteínas recombinantes;
- Avaliar o potencial de *L.innocua* como veículo de entrega para antígenos vacinais.

2.2 Específicos

- Avaliar o desempenho dos plasmídeos derivados do cerne do pHCMCO3 e pFG20;
- Avaliar a atividade dos novos promotores construídos P_{43^*} e P_{mrgA} em *B.subtilis*;
- Analisar comparativamente os sistemas de expressão desenvolvidos;
- Testar a capacidade dos sistemas desenvolvidos na expressão de proteínas desafio;
- Comparar o desempenho dos plasmídeos construídos com o único sistema epissomal comercialmente disponível;
- Avaliar o potencial de *L.innocua* na entrega de antígenos em ensaio *ex-vivo*;
- Verificar a resposta imunológica gerada após a imunização com linhagens de *L.innocua* capazes de produzir a proteína SBR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Condições de cultivo bacterianas

As diferentes linhagens de *B.subtilis* e *E.coli* utilizadas durante esse trabalho foram cultivadas a 37 °C em caldo LB sob agitação intensa (200 rpm) ou em ágar LB em placas de petri. As linhagens dotadas de plasmídeos multiplicaram-se na presença de antibióticos correspondentes a suas marcas de seleção. Tetraciclina e cloranfenicol foram utilizados na concentração final de 10 µg/mL, ao passo que ampicilina foi utilizada na concentração de 100 µg/mL. As cepas de *L.innocua* foram cultivadas em caldo ou ágar Brain Heart Infusion (BHI) a 30 °C. Da mesma forma que *B.subtilis* e *E.coli*, antibióticos foram adicionados nos cultivos de cepas de *L.innocua* dotadas de plasmídeo com o intuito de mantê-los ao longo das gerações. Outras condições de crescimento utilizadas em experimentos específicos serão descritas ao longo dessa seção.

3.2 Obtenção das sequências promotoras

A versão modificada do promotor da citidina desaminase (*cdd*), denominada de P_{43*} , foi obtida a partir da amplificação por PCR, utilizando os iniciadores Fw43best*EcoRI* e Rv43BEST*BamHI* (Quadro 1) para clonagem nos derivados do pFG20 (Figura 1A) e Fwp43*SacI* e Rv43BEST*BamHI* (Quadro 1) para inserção no cerne do plasmídeo pHCMC03. Em ambos os casos, o DNA genômico de *B.subtilis* 1012 foi utilizado como molde. A referida versão conta com um RBS adicional derivado do promotor P_{gsiB} a qual é implicada no aumento da estabilidade do transcrito e na eficiência de transcrição (JURGEN; SCHWEDER; HECKER, 1998). O promotor P_{gsiB} , por sua vez, foi obtido por meio da digestão do plasmídeo pHCMC03 (NGUYEN et al., 2005) com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *BglII*, com a posterior purificação do fragmento de 385 pb. Esse fragmento é constituído pelo promotor P_{gsiB} , um sítio múltiplo de clonagem, contendo regiões para o reconhecimento específico das enzimas *BamHI*, *XbaI*, *AatII* e *SmaI* e uma sequência terminadora derivada do óperon do triptofano (*trp*) de *B.subtilis*. O promotor do gene *spoVG* de *B.subtilis*, denominado nesse trabalho de P_{VG} , foi obtido após reação de PCR utilizando os iniciadores FwVGS*SacI* e

RvVGBamHIOri(Quadro 1) para as clonagens envolvendo derivados do pHCMC03 ou FwVGEcoRI e RvVGBamHIOri(Quadro 1) para inserção nos derivados do plasmídeo pFG20 (Figura 1A). Ambas as amplificações foram conduzidas utilizando como molde o plasmídeo pFG34, gentilmente cedido pelo professor Frederico Gueiros Filho do Instituto de Química da USP.

Outras duas versões dos promotores P_{43^*} e P_{VG} com sítios para as enzimas de restrição *AatII* e *SmaI* foram obtidas durante as tentativas de clonagem no cerne dos plasmídeos derivados do pHCMC03. Para o promotor P_{43^*} reações da PCR foram conduzidas com o DNA cromossômico de *B. subtilis* como molde e os pares de iniciadores FwVGSacI e Rvp43AatII ou FwVGSacI e Rvp43SmaI (Quadro 1) para a obtenção de promotores com a extremidade 3' compatível respectivamente com os sítios enzimáticos *AatII* e *SmaI*. Procedimento semelhante foi conduzido para obtenção de versões do promotor P_{VG} com os mesmos sítios para as referidas enzimas. Nesse último caso, o plasmídeo pFG34 foi utilizado como molde e os pares de iniciadores FwVGSacI e RvpVGAatII ou FwVGSacI e RvpVGSmaI (Quadro 1) foram utilizados respectivamente para obtenção de versões do P_{VG} com extremidades 3' compatíveis com as enzimas *AatII* e *SmaI*.

A versão original do promotor do gene *mrgA* (P_{mrgA}) foi obtida a partir da digestão do plasmídeo pBB-pameGFP (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010) (Figura 21A) com as enzimas *SacI* e *AatII* e da separação e purificação do fragmento correspondente a 2.358 pb gerado. Esse fragmento é composto pelo P_{mrgA} e pelo gene repórter eGFP, além de uma região pertencente ao plasmídeo de origem. A versão modificada desse promotor proposta pelo presente trabalho foi construída a partir da deleção da região reguladora do promotor denominada de *per box* (Figura 22A). Para tal feito, utilizou-se a técnica de *splice overlap extension* (SOE) (HORTON et al., 1989). Os dois fragmentos iniciais foram gerados por meio de duas reações de PCR distintas utilizando os pares de iniciadores FwMrgA e RVSoemrgAΔ ou FwSoemrgAΔ e RvMRgA (Quadro 1). Para obtenção do promotor mutado, denominado de $P_{mrgAΔ}$, quantidades equimolares dos dois fragmentos obtidos foram submetidos à nova PCR com os iniciadores FwMrgA e RvMRgA. Essa última PCR foi realizada com gradiente de temperatura de anelamento que variou entre 53°C e 60°C.

3.3 Clonagem dos promotores P_{43^*} e P_{VG} no cerne de derivados do pHCMC03

As clonagens nesse cerne envolveram a substituição do promotor P_{gsiB} pelos promotores P_{43^*} e P_{VG} . Inicialmente, o plasmídeo pHCMC03 (Figura 1B) foi tratado com as enzimas *SacI* e *BamHI* e o fragmento maior de 6.653 pb, correspondente ao cerne do plasmídeo sem promotor, foi submetido à ligação com os promotores P_{VG} ou P_{43^*} obtidos na etapa anterior e previamente tratados com as mesmas enzimas de restrição. Em outras tentativas de clonagem desses promotores, o plasmídeo pHCMC03 foi tratado com as enzimas *SacI* e *SmaI* ou *SacI* e *AatII* para liberação do promotor original. Os plasmídeos sem promotor gerados foram submetidos a reações de ligação com os promotores P_{43^*} e P_{VG} com sítios específicos para cada caso, descritos no item anterior, previamente tratados com as enzimas de restrição adequadas.

Outras tentativas envolveram a utilização de um derivado do pHCMC03, denominado de pHT01 (NGUYEN et al., 2007) (Figura 8B). Esse plasmídeo é bastante semelhante ao primeiro, o pHCMC03. As principais modificações contemplam a remoção de regiões repetitivas e a troca do promotor P_{gsiB} , induzido por estresse, pelo promotor P_{grac} , induzido pela adição de análogos da lactose. Como o sítio múltiplo de clonagem do pHT01 é idêntico ao do pHCMC03, as mesmas estratégias de clonagem descritas acima foram utilizadas. Dessa forma, os experimentos de clonagem envolveram a substituição do cassete de expressão do pHT01 pelos promotores P_{43^*} e P_{VG} . A remoção do P_{grac} foi conduzida a partir da digestão do plasmídeo pHT01 com as enzimas *SacI* e *BamHI*, com o posterior isolamento e purificação do fragmento de 6.417 pb, o qual corresponde ao arcabouço desse plasmídeo sem a unidade de expressão. Esse último foi, em seguida, submetido a reações de ligação com os promotores P_{43^*} e P_{VG} dotados de sítios para as mesmas enzimas e previamente digeridos por estas. Tentativas de clonagem adicionais desses promotores envolveram a utilização de outros sítios de restrição, em estratégia semelhante à descrita acima para o plasmídeo pHCMC03, utilizando os sítios para *SacI* e *AatII* ou *SacI* e *SmaI*.

3.4 Construção dos plasmídeos da série pFG20

As construções realizadas no arcabouço do plasmídeo pFG20 (Figura 1A) envolveram a substituição do cassete de expressão da xilose pelos promotores P_{gsiB} , P_{VG} ou P_{43*} . A remoção do cassete foi conduzida a partir da digestão do pFG20 com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. O fragmento de 7.413 pb correspondente ao arcabouço plasmidial sem a unidade de expressão foi isolado e purificado. Em seguida, esse último foi submetido à ligação com o P_{gsiB} obtido do pHCMC03 (seção 3.2), dando origem ao plasmídeo pFGgsiB. Os outros dois plasmídeos desta série foram obtidos a partir da substituição do promotor do pFGgsiB pelos promotores P_{VG} ou P_{43*} . A remoção do P_{gsiB} foi realizada por meio da digestão com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, seguida da separação e purificação do fragmento correspondente a 7.486 pb. Esse último foi submetido a reações de ligação com as sequências promotoras P_{VG} ou P_{43*} (descritos no item 3.1), previamente tratadas com as mesmas enzimas de restrição, dando origem respectivamente aos plasmídeos pFGVG e pFG43.

3.5 Construção de plasmídeos que codificam para a proteína verde fluorescente

No presente trabalho, utilizou-se a proteína verde fluorescente (*Greenfluorescent protein* - GFP) como repórter para mensurar o desempenho dos sistemas de expressão construídos. A utilização dessa proteína como repórter traz várias vantagens quando comparada a outros corriqueiramente utilizados para esse fim, tais como a betagalactosidase e a alfa amilase. Esses últimos estão sujeitos a variações na qualidade do substrato utilizado, necessitam de condições ótimas para o desempenho de sua atividade enzimática, tais como pH, temperatura, força iônica do meio, entre outros. Além disso, fornecem apenas um relato da atividade enzimática de uma cultura de células, dificultando a observação de fenômenos raros, bem como de comportamentos diversos dentro de uma população de células. No caso do GFP, a presença da própria proteína é detectada a partir da excitação/detecção nos comprimentos de onda adequados. Desse forma, a detecção desse último repórter é relato direto do desempenho do sistema de expressão e, portanto, menos suscetível a imprecisões. Além disso, a utilização desse repórter permite a análise da

produção individual das células em uma cultura por meio da utilização de técnicas como a citometria de fluxo.

O gene correspondente ao GFP foi obtido por PCR a partir do plasmídeo pMUTIN-GFP⁺ (KALTWASSER et al., 2002) e dos oligonucleotídeos Fwgf_pBglII e Rvgf_pAatII (Quadro 1). O fragmento de 736 pb obtido após a PCR foi tratado com as enzimas *Bgl*II e *Aat*II e submetido às reações de ligação com os plasmídeos construídos pFGgsiB, pFGVG ou pFG43, previamente tratados com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Aat*II, originando respectivamente os vetores pFGgsiB_GFP, pFGVG_GFP e pFG43_GFP. Realizou-se ainda duas construções adicionais baseadas plasmídeos pHCMC02 (NGUYEN et al., 2005) e pHT01(NGUYEN et al., 2007) com o objetivo utilizá-los como controle para os ensaios de detecção de GFP. Ambos os plasmídeos foram tratados com as enzimas *Bam*HI e *Aat*II e submetidos a reações de ligação com o fragmento correspondente à proteína GFP previamente digerido como descrito acima, originando respectivamente os vetores pHCMC02_GFP e pHT01_GFP.

3.6 Construção do plasmídeo pFGgsiB_gDE7

Além das construções descritas acima, realizou-se ainda a construção do plasmídeo pFGSI_gDE7. Esse plasmídeo codifica para proteína híbrida gDE7, a qual é composta pela fusão da glicoproteína D (gD) do vírus do Herpes tipo 1 (HSV-1) e da proteína de fase precoce 7 (E7) do vírus do Papiloma Humano tipo 16 (HPV-16). Essa fusão fora empregada em outros trabalhos do nosso grupo como vacinas de DNA ou de subunidade e mostrou-se eficaz na prevenção de tumores induzidos por HPV em modelo de desafio murino. (DINIZ et al., 2010; LASARO et al., 2005; PORCHIA et al., 2011). A expressão dessa proteína híbrida não foi alcançada em níveis detectáveis em linhagens geneticamente modificadas de *B. subtilis* a partir do uso de diferentes sistemas de expressão (CAVALCANTE, 2008). Devido às dificuldades de expressão nesse hospedeiro, essa proteína foi empregada no presente trabalho como desafio para os novos vetores desenvolvidos. Para tal feito, utilizamos uma versão dessa proteína com os códons adaptados para expressão em *B. subtilis* adquirida da empresa GenScript na forma do plasmídeo pBSK-gDE7b (Figura 20A). Esse último, foi tratado com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I e o fragmento de 1.284 pb correspondente ao

gene que codifica para proteína gDE7 foi isolado e purificado. Em seguida, o plasmídeo pFGgsiB foi digerido com as mesmas enzimas e submetido à ligação com o fragmento obtido no passo anterior, dando origem ao plasmídeo pFGgsiB_gDE7.

3.7 Competência e transformação em *E. coli*

A competência química e transformação térmica de *E. coli* foram realizadas de acordo com protocolos descritos por Sambrook (2001). Para a indução de competência, uma unidade formadora de colônia (UFC) de *E.coli*, previamente isolada em meio LB contendo $MgCl_2$ (25 mM), foi inoculada em 5 mL de caldo LB e incubada a 37 °C, 200 rpm por 16 horas. Em seguida, 500 µL da cultura foram inoculados em 50 mL de LB e incubados a 37 °C até atingir a D.O a 600nm de 0,5 – 0,6. A cultura foi mantida em gelo por 15 minutos e depois centrifugada (5.000 rpm, 10 minutos a 4 °C). As células foram suspensas em 16 mL de RF1 (100 mM RbCl, 50 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 30 mM de acetato de potássio, 10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15% de glicerol, pH ajustado para 5,8 usando ácido acético 0,2 M) e mantidas em gelo por 30 minutos, seguido por nova centrifugação (5.000 rpm, 10 minutos a 4 °C). Logo após, a amostra foi suspensa em 4 mL de RF2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15% de glicerol e pH ajustado para 6,8, usando solução de NaOH a 1 M) e mantida em gelo por 15 minutos. Amostras de 200 µL foram imediatamente acondicionadas em micro tubos, congeladas usando nitrogênio líquido e estocadas a – 80 °C.

Para a transformação, foi usada uma amostra de células quimio-competentes (200 µL) para cada vetor a ser transformado. As células foram incubadas em gelo por 10 minutos e a mistura de ligação foi adicionada. O conjunto foi incubado em gelo por 35 minutos e colocado em banho-maria a 42 °C por 2 minutos. Imediatamente, a mistura foi incubada em gelo por 10 minutos e foi adicionado 800 µL de SOC (2% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM glicose), para cada tubo de transformação. Em seguida, a amostra foi incubada por 90 minutos a 37 °C com agitação leve (100 rpm). Decorrido esse período, a suspensão bacteriana obtida foi semeada em placas de LB contendo os antibióticos de escolha e mantida a 37 °C por uma noite, para obtenção das colônias transformantes.

3.8 Competência e transformação em *B. subtilis*

As linhagens de *B. subtilis* preparadas para transformação seguiu protocolo descrito por Anagnostopoulos e Spizizen (1961). Linhagens de *B. subtilis* tornam-se competentes após cultivo em meio HS (S-Base 1X; 2% de glicose; 0,1% de L-triptofano; 1% de extrato de levedura; 0,2% de casaminoácidos; 0,8% de arginina; 0,04% de histidina) até o início da fase estacionária (D.O a 600nm igual ou superior a três). Nessa D.O foi adicionado 1 mL de glicerol 80% para cada 10 mL de cultura competente e esta foi separada em amostras (1 mL) e armazenadas a – 80 °C até sua utilização.

Para a transformação de *B. subtilis*, uma amostra de célula competente foi inoculada em 10 mL de meio LS (S-Base 1X; 2% glicose; 0,01% L-triptofano; 0,2% casaminoácidos; 0,2% extrato de levedura; 50 mM MgCl₂). A cultura foi incubada por 2 horas a 30 °C sob agitação constante. Decorrido este período, foi adicionado 100 µL de EGTA (Ácido etilenoglicol tetracético) e incubou-se novamente a 30 °C por 5 minutos. Em seguida, uma amostra de 1 mL foi retirada e o vetor de interesse, adicionado. Seguiu-se mais uma incubação a 37 °C por 2 horas sob agitação. Ao final, a cultura foi centrifugada, o precipitado suspenso em 200 µL de meio LS, semeado em placas LB contendo o antibiótico de escolha e incubado por uma noite a 37 °C.

3.9 Técnicas de Biologia Molecular

As metodologias empregadas durante as reações de digestão e ligação de fragmentos de DNA, bem como as técnicas de extração plasmidial e das reações em cadeia da polimerase (PCR) estão descritas em Sambrook (1989). As reações de digestão foram realizadas com aproximadamente uma unidade de cada enzima para cada micrograma de DNA, durante uma noite na temperatura recomendada pelo fabricante. As reações de ligação foram executadas por 16 horas a temperatura ambiente (20 °C) com aproximadamente 200 ng do vetor para cada 100ng do inserto e uma unidade de T4 DNA ligase. A extração plasmidial dos transformantes (*miniprep*) foi conduzida por lise alcalina com posterior precipitação do DNA plasmidial com isopropanol. O ciclo da PCR empregado compreendeu fase inicial de desnaturação 96 °C durante cinco minutos, seguida de 30 ciclos

constituídos por 3 passos: 96 °C 2 minutos, 60 °C 1 minuto, 72 °C 1,5 minuto e, por fim, empregou-se ciclo único de 72 °C durante 20 minutos.

3.10 Detecção da produção de GFP por luminometria

Nesses ensaios as linhagens de *B. subtilis* produtoras de GFP foram crescidas em caldo LB na presença do antibiótico adequado a partir de um pré-inóculo, incubado previamente por uma noite, até atingir densidade ótica a 600nm ($D.O_{600nm}$) de 0,6 - 0,8. Atingida a densidade ótica desejada, foram realizadas diluições 1:2 da cultura em LB, seguidas da aplicação das condições de indução. As condições empregadas foram: crescimento sem estímulo (crescimento 37 °C sob agitação constante), adição de Isopropil β -D-1-thiogalactopiranosídeo - IPTG (0,1mM a 1mM), adição de etanol (2% a 8%), adição de NaCl (2% a 8%) ou aumento da temperatura para 45 °C. Após quatro horas de crescimento nessas condições, 1 mL de cada cultura foi centrifugado a 10.000 rpm por cinco minutos. As massas celulares obtidas foram submetidas a três lavagens consecutivas com solução de PBS 1X e suas $D.O_{600nm}$ ajustadas para aproximadamente 0,4 na mesma solução tampão. 100 μ L das suspensões bacterianas foram dispostas em triplicata em placas negras de 96 poços de fundo translúcido Costar (Fisher Scientific). A detecção da produção de GFP foi conduzida por meio da utilização do equipamento *Spectramax M5 plate reader (Molecular Devices)*. Neste, as culturas foram submetidas à radiação luminosa no comprimento de onda de 485nm e a emissão de luz proveniente das moléculas de GFP produzidas foi captada no comprimento de 538nm. Em outros ensaios, observou-se a produção de GFP após uma noite de crescimento. Nesses casos nenhuma condição de estresse adicional foi empregada e o mesmo protocolo de detecção descrito acima foi aplicado. A produção de GFP por cada sistema de expressão encontra-se representada nesse trabalho em Unidades Arbitrárias de GFP (UAG). Essa unidade compreende o quociente entre o valor absoluto de fluorescência detectada pelo equipamento e a densidade ótica apresentada por cada cultura. Todos os experimentos envolvendo luminometria foram conduzidos em triplica e reproduzidos pelo menos três vezes.

3.11 Detecção da produção de GFP por citometria de fluxo

As linhagens de *B.subtilis* produtoras de GFP foram cultivadas por uma noite em frasco de 250 mL com 50 mL de meio LB a partir de colônias isoladas em placa de petri. Alíquotas de 1 mL foram coletadas em triplicata de cada cultura, centrifugadas a 10.000 rpm por cinco minutos e submetidas a três lavagens com PBS. Ao final das lavagens, as massas celulares foram suspendidas em 200 µL do mesmo tampão e analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience, Miami, Florida). Os eventos foram selecionados para cada linhagem a partir da observação da distribuição das células por tamanho e granulosidade em escala logarítmica, selecionando intervalos que contemplassem pelo menos 90% das células em análise. Pelo menos 300.000 eventos foram captados em cada amostra e a emissão de luz pelas moléculas de GFP foi captada a 578 nm utilizando o filtro para o fluoróforo FITC (isotiocianato de fluoresceína). Os dados obtidos foram representados na forma de histogramas e gráficos em barras confeccionados com o auxílio dos programas computacionais *Flow Jo* versão 10 (*Tree Star*) *GraphPad Prism* versão 5.

3.12 Observação das linhagens de *B.subtilis* produtoras de GFP por microscopia ótica

Alíquotas de 100 µL foram colhidas após o cultivo por uma noite das linhagens de *B.subtilis* produtoras de GFP. Centrifugou-se a suspensão bacteriana e procederam-se três lavagens com PBS 1X. Ao fim das lavagens, adicionou-se 1 mL de PBS e alíquotas de 10 µL foram dispostas em lâminas para microscopia ótica. A fixação do esfregaço foi realizada por calor em chama de bico de Bunsen. As lâminas foram observadas ao microscópio ótico de contraste de fase com suporte à fluorescência utilizando objetiva de imersão (100x) (EVOS fl, AMG, Bothell, USA). Pelo menos dez amostras foram analisadas de cada linhagem e 20 campos foram fotografados em cada lâmina.

3.13 Plasmídeos para expressão heteróloga em *L.innocua* e *B.subtilis*

Os plasmídeos pAM401_OVA e pAM401_ak2t_cytoLLO_OVA (Figura 23) são derivados do plasmídeo pAM401 e foram gentilmente cedidos pelo professor Darren Higgins

da Harvard Medical School (WIRTH et al., 1986). O primeiro codifica apenas para ovalbumina, enquanto que o segundo produz além dessa proteína, a listeriolisina O (LLO) de *L.monocytogenes*. Esses plasmídeos, advém do pAM β 1 e por isso replicam-se em diferentes espécies de bactérias gram-positivas, dentre elas *L.innocua* e *B.subtilis*. As unidades de expressão heteróloga são controladas por uma versão do promotor do bacteriófago de *B.subtilis*sp01, denominado de *P_{hyper}*. Essa variante contempla uma modificação pontual na sequência promotora e a inserção, à jusante, da sequência não traduzida da proteína listeriolisina O de *L.monocytogenes*(QUISEL et al., 2001; SHEN; HIGGINS, 2005). Esses dois plasmídeos foram empregados na construção de linhagens recombinantes de *B.subtilis* e *L.innocua* para realização de ensaios com as células B3Z (SANDERSON;SHASTRI, 1994).

Além da ovalbumina, foi também construído um plasmídeo capaz de dirigir a expressão da proteína SBR (*Saliva Bind Region*). Essa proteína compreende apenas um fragmento da proteína P1 de *Streptococcus mutans*, o principal agente etiológico da cárie dental(LEHNER;CHALLACOMBE; CALDWELL, 1975). Essa região, como o próprio nome sugere, está ligada ao processo de adesão à superfície dental e é o principal alvo de estratégias vacinais contra essa patologia(GIACHINI; PIERLEONI, 2002;KELLY et al., 1995; KOGA et al., 1990; YOUNSON; KELLY, 2004). O referido plasmídeo foi construído a partir do pAM401_OVA, substituindo-se o gene da ovalbumina pelo da proteína SBR. Para tal feito, o gene da ovalbumina juntamente ao promotor *P_{hyper}* foram removidos do plasmídeo pAM401_OVA pelo uso de enzimas de restrição *Nru*I e *Sal*I. O fragmento de 10.363 pb correspondente ao arcabouço plasmidial foi isolado e purificado e, em seguida, submetido à reação de ligação com a fusão gênica entre o gene da SBR e o promotor *P_{hyper}* previamente tratada com as endonucleases de restrição *Nru*I e *Sal*I. Essa fusão foi obtida após a realização de SOE utilizando os plasmídeos pAM401_OVA e pLDV1 (TAVARES et al.,2010) como moldes. O fragmento correspondente ao promotor *P_{hyper}* foi obtido a partir de reação da PCR com os iniciadores SBR5' e SBRSOERv(Quadro 1) utilizando o pAM401_OVA como molde, ao passo que o gene relativo à SBR foi alcançado após amplificação por PCR com os iniciadores SBRSOEFw e SBR3'SalI(Quadro 1) e o pLDV1 como molde. O fragmento SOE utilizado na clonagem descrita acima foi obtido a partir de nova PCR utilizando quantidades equimolares dos dois fragmentos obtidos na etapa anterior como molde e o par de iniciadores SBR5' e SBR3'SalI. A confirmação da clonagem foi conduzida por análise de restrição após a digestão com as enzimas *Nru*I e *Sal*I por análise de sequenciamento.

3.14 Competência e transformação em *L.innocua*

A transformação de *L. innocua* foi realizada por eletroporação de acordo com o protocolo descrito por Park e Stewart (1990). A partir de colônia isolada em Ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), fez-se pré-inóculo em 10 mL de caldo BHI e incubou-se a 37 °C durante uma noite com agitação intensa. Decorrido esse período, tomou-se 3 mL da cultura crescida e fez-se um inóculo em 100 mL de caldo BHI sacarose (0,5M) utilizando um erlenmeyer de 1 L. Em seguida, incubou-se a 37°C sob agitação intensa até atingir densidade ótica a 600nm de 0,2. Após esse período, adicionou-se penicilina na concentração final 10 µg/mL e submeteu-se ao crescimento sob agitação branda por mais duas horas. Em seguida, centrifugou-se a cultura (7000 rpm por 10 minutos a 4°C), descartou-se o sobrenadante e procedeu-se duas lavagens com meio HEPES 1mM/sacarose 0,5M. A primeira com 100 mL e a segunda com 40 mL. Em seguida, suspendeu-se a massa bacteriana obtida em 10 mL de tampão HEPES/Sacarose com lisozima na concentração final de 100 µg/mL e manteve-se a suspensão a 37°C por 20 minutos a 4 °C. Decorrido esse período, centrifugou-se a suspensão bacteriana (5.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C). Na sequência, as células bacterianas obtidas com 10 mL da solução HEPES/Sacarose e, em seguida, suspendeu-se a massa bacteriana em 300 µL de HEPES/Sacarose. Tomou-se 100 µL da solução gerada e adicionou-se de 1-2µg de DNA e, em uma cubeta de eletroporação, aplicou-se um pulso de 1 KV a 400 ohms e 25 µF. Imediatamente, adicionou-se 1mL de caldo BHI pré-aquecido suplementado com 0,5 M de sacarose (37°C) e incubou-se durante 1 h a 37°C sem agitação. Finalmente, plaqueou-se a mistura em uma placa com Ágar BHI com o antibiótico de seleção adequado.

3.15 Preparação das linhagens recombinantes de *B.subtilis* e *L.innocua* para realização de ensaios com as células B3Z e para detecção de expressão *in vitro*

A partir de colônias isoladas das linhagens recombinantes de *L.innocua* e *B.subtilis*, foram realizados pré-inóculos para cada linhagem. Após o cultivo por uma noite, realizou-se inóculo (1:100) em frascos de 250 mL com 20mL de meio líquido e manteve-se a cultura sob agitação intensa a 37 °C até atingir a densidade ótica a 600 nm de 0,6. Em seguida, centrifugou-se a cultura (6.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C). A massa celular obtida foi lavada por três vezes com tampão PBS e o número de células foi padronizado em 10⁸ UFC

para realização do ensaio *ex-vivo*. Para esse último, diluições decimais foram realizadas, compreendendo títulos bacterianos que variaram de 10^8 a 10^4 UFC. No caso do preparo das células para detecção da expressão *in vitro*, a massa celular obtida após a centrifugação da cultura foi suspensa em 1 mL de tampão de lise (10 mM de TRIS, 1 mM EDTA pH8 e 50 µg/mL de lisozima) e incubado a 37 °C durante uma hora. Decorrido esse período, adicionou-se o mesmo volume de tampão de amostra (Tris/HCl 100mM pH 6,8; SDS 4,0%; Azul de bromofenol 0,2%; ditionitrito 200 mM; Glicerol 20%) e submeteu-se a mistura à fervura 100 °C durante cinco minutos, seguido do congelamento a -20 °C até a corrida em SDS PAGE de acordo com Sambrook(1989).

3.16 SDS-PAGE e Western blot

A eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi feita segundo protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (2001), e usando o aparelho *Mini Protean II vertical electrophoresis unit* (Miniprotean, BioRad®: Berkeley, California, EUA). Nesses ensaios, foram utilizados géis de poliacrilamida na concentração de 15%. Os *Western blots* foram realizados após a transferência do extrato proteico dos géis de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose. Essas últimas foram incubadas com anticorpos específicos para cada caso, seguidos da utilização de anticorpos anti IgG conjugados à peroxidase (Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA). As bandas reativas foram evidenciadas com reativos de quimiluminescência (Super Signal®, Pierce:Rockford, IL, USA), como descrito pelo fabricante.

3.17 Ensaios com células B3Z

Os métodos aplicados para a realização desses ensaios foram descritos por Bouwer e colaboradores (2005). No primeiro dia de experimento, as células B3Z (SANDERSON; SHASTRI, 1994) foram descongeladas e cultivadas em 11 mL de meio RPMI1640 em placas de petri de 100 mm tratadas para o cultivo de tecidos. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Paralelamente, as células apresentadoras de antígenos (APC) RAW 309 Cr.1 (ATCC® TIB- 69™) foram cultivadas nas mesmas condições, inclusive o mesmo meio de cultivo. Em geral, essas duas células demoraram cerca de quatro dias com apenas uma

troca de meio para atingir confluência total nas placas de cultivo. Decorrido esse período, as células RAW 309 Cr.1 foram dispostas em placas de 96 poços (Corning Costar) na quantidade de 10^5 APC por poço. As diferentes suspensões bacterianas de *L.innocua*, descritas no item anterior foram incubadas em triplicata com as células apresentadoras de antígenos por 90 minutos a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Decorrido esse período, sucederam-se duas lavagens com PBS e 10^5 células B3Z suspensas em 200 µL de meio RPMI fresco foram dispostas em cada poço contendo as células APC e as linhagens de *L.innocua* fagocitadas. A placa foi novamente incubada nas mesmas condições por 15 a 20 horas. Decorrido esse período, o meio RPMI foi removido e 100 µL de tampão Z (4,5 g de CPRG; 49 mL de PBS pH 7,1; 450 µL de MgCl₂ 1 M; 62,5 µL de NP-40; 91 µL de β-mercaptoetanol) foi adicionado a cada poço da placa. A reação processou-se por quatro a cinco horas e as amostras foram lidas no leitor de placas *Spectromax plate reader* (Molecular Devices). Os gráficos referentes a esses ensaios foram construídos no programa computacional *GraphPad Prism* versão 5.

3.18 Ensaio de imunização e coleta de material para as análises de resposta imune.

Os ensaios de imunização e de análise da resposta imune induzidas foram realizados durante período de estágio no laboratório do professor Darren Higgins na Harvard Medical School. Grupos de cinco camundongos BalbC isogênicos, fornecidos pelo departamento de Microbiologia e Imunologia da mesma Universidade, foram imunizados por via subcutânea com três doses de 10^8 UFC de *B.subtilis* ou *L.innocua* com intervalos de sete dias entre as doses. As amostras de soro foram colhidas um dia antes da primeira dose (amostras pré-ímmunes) e no dia anterior a cada dose. A coleta de sangue dos animais foi realizada por punção submandibular. Após a coleta, o sangue foi mantido a temperatura ambiente por 30 minutos, incubado a 4 °C por mais 30 minutos e, por fim, centrifugado a 5.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Após esse período, o soro foi obtido a partir da fase superior translúcida e imediatamente acondicionado a – 20 °C até o momento da análise.

3.19 Detecção de anticorpos IgG específicos para proteína SBR

Os títulos de anticorpos específicos para proteína SBR foi determinado a partir do soro de animais imunizados por ensaio de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Inicialmente, placas de 96 poços MaxiSorp (Nunc) foram sensibilizadas com a proteína SBR purificada diluída em PBS, empregando-se 100 ng/poço por um período de 16 horas a 4 °C. As placas foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 0,05% e bloqueadas com PBS-Tween-Leite 5% por duas horas a 37 °C. *Pools* de anticorpos colhidos dos grupos experimentais foram diluídos em série na base dois, iniciando em 1:50, e adicionados em duplicata aos poços das placas de 96 poços previamente sensibilizadas. Procedeu-se a incubação por 2 horas a 37 °C. Após esse período, foram realizadas duas lavagens com solução de PBS-Tween e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) na diluição 1:4.000 foi adicionado às placas. Novamente, incubou-se as placas por duas horas a 37 °C. Decorrido esse período, sucederam-se mais duas lavagens e as placas foram reveladas com tampão Citrato de sódio (pH 5,8) contendo OPD e H₂O₂ a 12%. Após 20 minutos a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 2 M. A absorbância foi mensurada a 492 nm em leitora de placas (LabSystem). Todas as amostras foram testadas em duplicata. O valor de absorbância do soro pré-imune foi usado como branco. As curvas de diluição foram feitas para cada amostra e os títulos foram calculados como logaritmo da maior diluição com densidade ótica superior a 0,1.

3.20 Detecção de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ específicos produtores de INF-γ

Sete dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e seus baços removidos para análise de linfócitos T específicos. Suspensões de células esplênicas foram obtidas após a trituração dos baços dos camundongos de cada grupo experimental. Em seguida, as células foram submetidas ao tratamento com o tampão ACK (*Ammonium Chloride Potassium*: 0,15 M de NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1 mM EDTA) para lise dos eritrócitos presentes. Os esplenócitos foram estimulados em placas de 16 poços por 24h, a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂ na presença de 100 ng por poço da proteína SBR purificada. Decorrido

esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS suplementado com soro fetal bovino a 2%. A marcação de linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ foi realizada com anticorpos conjugados a fluoróforos, respectivamente anti-CD8 FITC (isotiocianato de fluoresceína) e anti-CD4 Cy (Cianina) (BD Bioscience, Miami, Florida). Em seguida, as células foram novamente lavadas, fixadas com paraformaldeído e permeabilizadas com saponina. A marcação intracelular foi conduzida com anticorpos específicos para interferon gama (IFN- γ) conjugado à fluoróforo, IFN- γ PE (ficoeritrina) (BD Bioscience, Miami, Florida). A detecção dos linfócitos por citometria de fluxo foi conduzida no equipamento FACSCalibur (BD Bioscience, Miami, Florida) e as células detectadas com marcação dupla, CD8⁺ e IFN- γ ⁺ ou CD4⁺ e IFN- γ ⁺ foram consideradas específicas para o antígeno alvo SBR. As análises dos dados de citometria foram realizadas com o auxílio do programa computacional FlowJo versão 10.0 (Tree Star).

3.21 Análises estatísticas

À exceção dos experimentos de imunização, todos os resultados apresentados nesse trabalho são fruto da observação e análise de pelo menos três experimentos distintos. A análise da significância estatísticas das diferenças observada entre os grupos experimentais foi realizada por teste de ANOVA com confirmação pelo teste de Bonferroni. A confecção dos gráficos e os testes estatísticos foram realizados no programa computacional *GraphPad Prisma* versão 5.01.

Quadro 1- Iniciadores utilizados durante o trabalho.

Iniciador	Sequencia 5'-3'	Sítio de restrição
FwVGEcoRI	ggtacgaattcccgaaggatgcgttagtcg	EcoRI
FwVGSacI	ggtacgagctcccgaaggatgcgttagtcg	SacI
RvVGBamHI	cgtagcggatccttcgaactccaacatgctaaatcc	BamHI
RvVGAatII	cgtagctctagattcgaactccaacatgctaaatcc	AatII
RvVGSmaI	cgtagcccggttcgaactccaacatgctaaatcc	SmaI
Fwp43EcoRI	cgaatatgaattcttgataggtggtatgtttcgcttgaac	EcoRI
Fwp43SacI	cgaatatgagctcttgataggtggtatgtttcgcttgaac	SacI
Rvp43BamHI	gctaggatccttctgtctgttcattgtacattcc	BamHI
Rvp43AatII	gctatctagattctgtctgttcattgtacattcc	AatII
Rvp43SmaI	gctaccgggtctgtctgttcattgtacattcc	SmaI
FwMrgA	cttacaatttcattcgccattcaggctgc	-
RvMRgA	gacgtctagattactgtacagctcgccatgcc	AatII
FwSoemrgAΔ	gaaaaagctattcagctgattattgattttatttagtatatg	-
RVSoemrgAΔ	catataactaaataaaaatcaataatcagctgaatagcttttc	-
FwOVABS	gagagtgggattccatgatccctgcag	BamHI
RVOVABS	gcttttcgacgtcttaagggaacacatc	AatII
SBR 3'SalI	acgcgtcgacttataacgcgacgtcatttggtc	SalI
SBR5'Nrul	acgctcgcgaattttgcaaaaagttgtgacttt	Nrul
SBRSOEFw	gtagaaggaagagtgaaccatggatgaaacgaccacta	-
SBRSOERv	agtagtggtcgtttcatccatgggtttcactctccttctac	-
FwgfpgBglII	gcatagatctatggctagcaaaggag	BglII
RvgfpgAatII	ccgactgacgtcttattgtagagctcatcc	AatII

Quadro 2- Linhagens bacterianas utilizadas durante o trabalho.

Linhagem	Características	Referência
<i>E.coli</i>		
DH5-α	<i>F</i> ϕ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR, recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺ phoA supE44λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen™
DH10B	<i>F</i> endA1 recA1 galE15 galk16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ ⁻	Invitrogen™
JM109	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB ⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB ⁺ lacI ^d lacZΔM15] hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺)	New England Biolabs (NEB)™
Sure	endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14- Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[proAB ⁺ lacI ^d lacZΔM15 Tn10]	Stratagene™
PamGFP	Linhagem albergando o plasmídeo pBB-panEGFP. Expressa GFP sob o controle do <i>P_{mrgA}</i>	RIBEIRO-DOS-SANTOS et al. (2010)
MrgAgfp	Linhagem albergando o plasmídeo pHCMRGA_GFP. Expressa GFP sob o controle do <i>P_{mrgA}</i>	Esse estudo
ECgDE7	Linhagem albergando o plasmídeo pBSK-gDE7b codifica para o gene sintético <i>gDE7</i>	Esse estudo
<i>B.subtilis</i>		
1012	<i>leuA8 metB5 trpC2 hsdR1amyE::neo.</i>	WEHRL; NIEDERWEIS; SCHUMANN, (2000)
RL322	Possui uma cópia adicional gene <i>spoOA</i> (σ ^H) sob o controle do <i>P_{spac}</i>	Cedido pelo Professor Frederico Gueiros Filho
EG366	Possui uma cópia adicional gene <i>spoOA</i> (σ ^H) sob o controle do <i>P_{hyper-spank}</i>	Cedido pelo Professor Frederico Gueiros Filho
HT01	Alberga o plasmídeo comercial pHT01	NGUYEN et al. (2007)
HCMC03	Alberga o plasmídeo pHCMC03	NGUYEN et al.(2005)
HCMC02	Alberga o plasmídeo pHCMC02	NGUYEN et al.(2005)
FG20	Alberga o plasmídeo pFG20	Esse estudo
FGgsiB	Alberga o plasmídeo pFGgsiB	Esse estudo
FGVG	Alberga o plasmídeo pFGVG	Esse estudo
FG43	Alberga o plasmídeo pFG43	Esse estudo
HT01_GFP	Alberga o plasmídeo pHT01_GFP produz GFP sob o controle do promotor <i>P_{grac}</i>	Esse estudo
HCMC03_GFP	Alberga o plasmídeo pHCMC03_GFP e produz GFP sob o controle do promotor <i>P_{gsiB}</i>	Esse estudo
FGgsiB_GFP	Alberga o plasmídeo pFGgsiB_GFP e produz GFP sob o controle do promotor <i>P_{gsiB}</i>	Esse estudo
FGgsiB_gDE7	Alberga o plasmídeo pFGgsiB_gDE7 e produz GFP sob o controle do promotor <i>P_{gsiB}</i>	Esse estudo
FGVG_GFPa	Linhagem RL104 albergando o plasmídeo pFGVG_GFP. Codifica para GFP sob o controle do <i>P_{VG}</i>	Esse estudo
FGVG_GFPb	LinhagemRL322 albergando o plasmídeo pFGVG_GFP. Codifica para GFP sob o controle do <i>P_{VG}</i>	Esse estudo

Continua

Quadro 2- Linhagens bacterianas utilizadas (*continuação*)

Linhagem	Características	Referência
<i>B.subtilis</i>		
FG43_GFP	Alberga o plasmídeo pFG43_GFP e produz GFP sob o controle do promotor P_{43^*}	Esse estudo
BS_SBR	Alberga o plasmídeo pAM_SBR e produz SBR sob o controle do promotor P_{hyper}	Esse estudo
BS_OVA	Alberga o plasmídeo pAM_OVA e codifica para OVA sob o controle do promotor P_{hyper}	Esse estudo
BS_LLO_OVA	Alberga o plasmídeo pAM401_ak2tcyto_LLO_OVA e codifica para as proteínas OVA e LLO sob o controle do promotor P_{hyper}	Esse estudo
BSMRGA_GFP	Linhagem albergando o plasmídeo pHCMRGA_GFP. Codifica para GFP sob o controle do P_{mrgA}	Esse estudo
<i>L.innocua</i>		
CLIP 11262	Linhagem laboratorial sequenciada	GLASER et al. (2001)
LI_SBR	Alberga o plasmídeo pAM_SBR e produz SBR sob o controle do promotor P_{hyper}	Esse estudo
LI_OVA	Alberga o plasmídeo pAM_OVA e codifica para OVA sob o controle do promotor P_{hyper}	Esse estudo
LI_LLO_OVA	Alberga o plasmídeo pAM401_ak2tcyto_LLO_OVA e codifica para as proteínas OVA e LLO sob o controle do promotor P_{hyper}	Esse estudo
<i>L.monocytogenes</i>		
Lmdd	Δdal , Δdat ; crescimento dependente de D-alanina	THOMPSON et al.(1998)
Lmdd_OVA	Δdal , Δdat ; crescimento dependente de D-alanina. Alberga o plasmídeo pAM401_OVA e codifica para OVA sob o controle do promotor P_{hyper} . O cassete de expressão nativo de LLO não foi alterado	Esse estudo

4 RESULTADOS

Como objetivo de organizar o trabalho, bem como de facilitar a compreensão dos resultados aqui descritos, dividiu-se esse texto em duas partes. A primeira versa sobre os achados relativos à construção e avaliação de novos sistemas de expressão heteróloga para *B.subtilis*. Ao passo que a segunda contempla os achados relativos à avaliação da bactéria Gram-positiva *Listeria innocua* como veículo de entrega para antígenos vacinais.

4.1 Construção de sistemas de expressão para *B.subtilis*

Como primeiro passo para construção dos novos sistemas de expressão heteróloga para *B.subtilis*, as sequências correspondentes aos promotores P_{43} e P_{VG} foram obtidas por reação da PCR. Como esperado, fragmentos correspondentes a 247 pb e a 313 pb foram obtidos; o menor corresponde a sequência nativa do promotor P_{VG} , enquanto que o fragmento de 313 pb, à nova versão construída do promotor P_{43} , denominada de P_{43}^* . Essa versão conserva o RBS nativo do P_{43} e adiciona, à jusante deste, a sequência de *Shine Dalgarno* (SD) nativa do promotor P_{gsiB} . Como já foi comentado no início desse trabalho, essa região é responsável pela alta estabilidade de transcritos oriundos do P_{gsiB} e, portanto, deve contribuir para o aumento da eficiência de tradução do RNA gerado. A figura 2B ilustra, de modo representativo, as regiões fundamentais do promotor P_{43} , bem como as modificações propostas nesse trabalho para construção do P_{43}^* .

plasmídeos obtidos eram sempre inferiores aos esperados, alcançando no máximo 3.000 pb. A Figura 3 ilustra uma análise de restrição representativa das diversas tentativas de clonagem envolvendo esse arcabouço plasmidial e os promotores P_{43^*} e P_{VG} . Nesse experimento, o resultado esperado seria a obtenção de dois fragmentos; um de aproximadamente 6.000 pb correspondente à grande parte do plasmídeo de origem e outro, de aproximadamente 900pb, composto por parte do plasmídeo e os promotores P_{43^*} ou P_{VG} . No entanto, obteve-se apenas fragmentos únicos, cujo tamanho, em pares de base, variou entre 3.000 pb e 1.000 pb, tanto para as clonagens envolvendo o promotor P_{43^*} (canaletas 12-19), como para o P_{VG} (canaletas 4-11) (Figura 3).

Figura 3- Análise de restrição representativa das tentativas de clonagem dos promotores P_{VG} e P_{43^*} no arcabouço dos plasmídeos derivados do pHCMC03.

Amostras: 1- Marcador GeneRuler™ 1kb (#1163 Fermentas), 2- pHCMC03 digerido com a enzima *Sall*, 3- pHCMC03 circular, 4 a 11- Produtos das digestões com a enzima de restrição *EcoRI* dos diferentes clones obtidos durante as tentativas de clonagem do promotor P_{VG} no arcabouço do plasmídeo pHCMC03. 12 a 19- Produtos das digestões com a enzima de restrição *EcoRI* dos diferentes clones obtidos durante as tentativas de clonagem do promotor P_{43^*} no arcabouço do plasmídeo pHCMC03.

Com o objetivo de tentar resolver os problemas enfrentados durante as tentativas de clonagem, algumas estratégias foram empregadas: a) utilização de outros sítios de restrição para inserção dos novos promotores, b) emprego de outras linhagens de *E.coli* para realização das clonagens e c) utilização de outro arcabouço plasmidial derivado do pMTLBS72 (TITOK et al., 2003). Amplificou-se novamente os promotores P_{43^*} e P_{VG} com sítios de restrição modificados de *SacI* e *BamHI* para *SacI* e *AatII* ou *SacI* e *SmaI*, mas observou-se o mesmo fenômeno após diversas tentativas de clonagem no cerne do plasmídeo pHCMC03 (dados não mostrados). A substituição da linhagem de *E.coli* DH5- α pelas cepas DH10B, JM109 ou SURE também não resolveu o problema, e a instabilidade plasmidial persistiu (dados não mostrados). A última alternativa empregada foi substituir o plasmídeo pHCMC03 pelo plasmídeo comercial pHT01. Esse último é derivado do pHCMC03 e é descrito como mais estável em *E.coli* devido à supressão de regiões repetidas na sequência do plasmídeo (NGUYEN, PHAN, SCHUMANN., 2007). Apesar disso, as tentativas de clonagem no arcabouço do pHT01 apresentaram resultados semelhantes aos observados com o pHCMC03 (dados não mostrados). Devido à alta instabilidade estrutural observada nesses plasmídeos, decidiu-se direcionar o trabalho para as construções envolvendo o outro plasmídeo proposto nesse estudo, o pFG20.

Os plasmídeos da série pFG20 foram obtidos a partir da substituição do óperon da xilose pelos promotores, P_{gsiB} , P_{43^*} ou P_{VG} . A primeira construção foi obtida a partir da clonagem do promotor P_{gsiB} , oriundo do plasmídeo pHCMC03, no arcabouço do plasmídeo pFG20, dando origem ao plasmídeo pFGgsiB (Figura 4A). A construção dos outros dois plasmídeos foi atingida após a substituição P_{gsiB} do recém construído pFGgsiB pelos promotores P_{43^*} ou P_{VG} , originando, respectivamente, os plasmídeos pFG43 e pFGVG (Figuras 4B e 4C). Todas as construções foram confirmadas por análises de restrição e sequenciamento (dados não mostrados).

Nessa etapa do trabalho, três novos sistemas de expressão foram construídos baseados no arcabouço do plasmídeo de alta cópia pFG20. Além das novas regiões promotoras, todos eles contam com sítio múltiplo de clonagem contendo regiões de reconhecimento para as enzimas *BamHI*, *XbaI*, *AatII* e *SmaI* (destacados à direita de cada promotor na Figura 4) e um terminador transcricional derivado do óperon do triptofano de *B.subtilis*. Vale ainda destacar que durante as clonagens envolvendo esse arcabouço, não foi observada a instabilidade estrutural detectada nos derivados do plasmídeo pHCMC03 (dados

não mostrados). Finalmente, a cepa 1012 de *B.subtilis* foi transformada com os plasmídeos pFGgsiB e pFG43, originando respectivamente as linhagens FGgsiB e FG43 (Quadro 2). A estirpe RL104 de *B.subtilis* foi transformada com pFGVG dando origem a linhagem FGVG (Quadro 2).

Figura 4- Desenho esquemático dos três sistemas de expressão construídos com base no arcabouço do plasmídeo pFG20 e nos promotores P_{VG} , P_{gsiB} e P_{43*}

As principais regiões dos plasmídeos derivados do pFG20 foram destacadas na figura 1. As regiões promotoras de cada plasmídeo encontram-se realçadas em azul. Todos os sistemas de expressão contam com sítio múltiplo de clonagem, destacado nos desenhos à direita (à jusante) dos promotores. P_{VG} e P_{gsiB} apresentam RBS nativos, enquanto que o P_{43*} contém RBS duplo; o nativo, e outro derivado do P_{gsiB} localizado à jusante do primeiro (características representadas apenas na figura 2B).

Com o intuito de testar a funcionalidade e o desempenho dos três sistemas de expressão construídos, utilizou-se o gene que codifica para a proteína verde fluorescente (GFP) como repórter. Inicialmente, esse gene foi amplificado por PCRe, como esperado, um fragmento único correspondente a 742 pb foi obtido (dados não mostrados). Em seguida, esse último foi tratado com as enzimas *BglII* e *AatII* e submetido a reações de ligação com os plasmídeos pFGgsiB, pFG43 ou pFGVG previamente digeridos com as enzimas *BamHI* e *AatII*, originando, respectivamente, os plasmídeos pFGgsiB_GFP, pFG43_GFP e pFGVG_GFP. Novamente, a instabilidade plasmidial não foi observada durante as clonagens envolvendo o cerne do pFG20, o que aponta que esse fenômeno é restrito aos derivados do plasmídeo pHCMC03. Análises de restrição e sequenciamento confirmaram as três construções realizadas (dados não mostrados). Em seguida, cepas de *B. subtilis* 1012 foram transformadas com os plasmídeos pFGgsiB_GFP e pFG43_GFP gerando, respectivamente, as linhagens FGgsiB_GFP e FG43_GFP (Quadro2). A cepa de *B. subtilis* RL322 foi transformada com o plasmídeo pFGVG_GFP gerando a cepa FGVG_GFPa (Quadro2).

De posse das linhagens de *B. subtilis* albergando os três sistemas construídos dirigindo a produção da proteína repórter GFP, prosseguiu-se com a caracterização de cada plasmídeo, no intuito de encontrar a condição para expressão máxima de cada sistema. OP_{gsiB} é sabidamente regulado por estresse e os promotores P_{43} e P_{VG} possuem em sua sequência, além de seus respectivos sítios de ligação para os fatores sigma A e H (σ^A e σ^H), regiões compatíveis ao fator sigma ligado à resposta ao estresse global em *B. subtilis* (sigma B, σ^B). Devido a essas características, as condições de indução testadas incluíram o crescimento em condições ordinárias (37°C em meio LB sob agitação) e situações que visaram simular o estresse ambiental. As condições de estresse testadas compreenderam a adição de etanol (EtOH) ou de cloreto de sódio (NaCl), em concentrações que variaram entre 2% e 8%, e o estresse térmico, representado pela elevação da temperatura de incubação para 45°C. O desempenho de cada sistema foi medido a partir da produção de GFP, mensurado inicialmente por ensaio de excitação/detecção de fluorescência desta molécula em luminômetro. Os valores de fluorescência encontrados para cada sistema foram representados na forma de Unidades Arbitrárias de GFP (UAG). Essa unidade compreende o quociente entre o valor absoluto de fluorescência detectada pelo equipamento e a densidade óptica apresentada por cada cultura.

Os testes com a cepa de *B.subtilis* FGVG_GFPa iniciaram com o cultivo nas condições ordinárias descritas ou com a adição de diferentes concentrações de IPTG. A adição desse indutor permite a síntese do fator sigma H responsável pela regulação do P_{VG} , a partir de uma cópia do gene correspondente inserida artificialmente no cromossomo da linhagem utilizada (RL104) e controlada pelo promotor P_{spac} (Induzível por IPTG). Concentrações de IPTG que variaram de 0,1 mM a 1 mM não foram capazes de promover a produção de GFP em níveis significativos detectáveis pelo ensaio realizado (Figura 5A). O emprego de 0,1 mM do indutor resultou em valores médios de 0,34 ($\pm 0,05$) UAG, valores superiores aos atingidos após o cultivo sem estímulo ou na presença de outras concentrações de IPTG (Figura 5A). No entanto, análises estatísticas envolvendo testes de ANOVA e Bonferroni indicaram que não houve diferenças na detecção de GFP entre as condições testadas (Figura 5A).

Situações de estresse foram empregadas com o objetivo de promover a atividade do sistema pFGVG, uma vez que, como já citado, o fator σ^B produzido durante o estresse em *B.subtilis* pode também regular o P_{VG} . A aplicação dessas condições não foi suficiente para induzir a produção de GFP de modo significativo, quando comparado ao crescimento em condições ordinárias (sem estímulo) (Figura 5B). Algumas médias de detecção de GFP em situação de estresse foram superiores às encontradas no grupo controle (cultivo a 37°C sem estímulo), entretanto as análises estatísticas demonstraram que tais diferenças não foram significativas (Figura 5B). A aplicação de estímulos múltiplos foi outra estratégia utilizada para tentar estimular a atividade do P_{VG} . Nesses ensaios, empregou-se simultaneamente IPTG na concentração de 0,5 mM e as mesmas situações de estresse empregadas no ensaio anterior. Novamente, nenhum dos estímulos foi capaz de promover a atividade do novo sistema pFGVG e os valores atingidos, após os diferentes estímulos, foram estatisticamente semelhantes ao grupo controle (cultivo a 37°C sem estímulo) (Figura 5C).

A linhagem de *B.subtilis* RL322 também foi transformada com o plasmídeo pFGVG_GFP, dando origem à cepa FGVG_GFPb (Quadro 2). A linhagem EG366 possui um cópia do gene de sigma H no cromossomo sob o controle do promotor $P_{hyper-spank}$ o qual também é induzível por IPTG (Quadro 2). As mesmas condições de indução aplicadas para linhagem FGVG_GFPa foram aplicadas para essa nova cepa, no entanto, não houve detecção significativa do gene alvo (dados não mostrados). Até o momento da confecção desse

trabalho, não se soube precisar o motivo da ineficiência do sistema pFGVG na produção de GFP após o cultivo nas diferentes condições de indução.

Figura 5- Avaliação do desempenho da linhagem RL104 de *B.subtilis* albergando o plasmídeo pFGVG_GFP frente a diferentes condições de cultivo.

No eixo das ordenadas, estão dispostas as condições de cultivo empregadas e no das abscissas, a fluorescência detectada após quatro horas de crescimento. (A) Cultivo na presença de diferentes concentrações de IPTG. (B) Crescimento sob diferentes condições de estresse. (C) Cultivo em estímulo duplo: 0,5 mM de IPTG e diferentes condições de estresse. A fluorescência está expressa em unidades arbitrárias de GFP, a qual foi calculada a partir quociente entre a fluorescência obtida e a densidade ótica atingida por cada cultura nas diferentes condições de cultivo. A significância estatística das diferenças obtidas entre os grupos experimentais foi determinada por ANOVA e posterior teste de comparações múltiplas de Bonferroni, onde * indica $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. Os colchetes indicam as diferenças significativas entre os grupos. Os dados apresentados nesse gráfico são representativos de experimentos realizados em triplicata repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes. A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional *GraphPad Prism 5.0*. [EtOH] (%): Concentrações de etanol empregadas expressas em percentagem, Δ (°C): Temperatura em graus Celsius empregada, quando não indicada, cultivo a 37 °C. [NaCl] (%): Concentrações de cloreto de sódio aplicadas em percentagem. [IPTG] mM: concentração de IPTG utilizada em milimolar. [IPTG] 0,5 mM: Cultivo na presença de 0,5 mM de IPTG.

Os ensaios com a linhagem FGSIB_GFP envolveram o cultivo em situações de estresse, uma vez que o promotor P_{gsiB} é regulado por pelo fator sigma (σ^B), produzido principalmente nessas condições. O primeiro fato a gerar surpresa, foi a alta detecção de GFP após o cultivo em condições normais de crescimento (meio LB, 37°C e sob agitação), atingindo valores médios de 58,0 ($\pm 1,5$) UAG (Figura 6). O cultivo na presença de 2% e 4% etanol ou 2% e 8% NaCl não resultaram em incrementos significativos na detecção de GFP quando comparadas ao grupo controle (meio LB, 37 °C e sob agitação) (Figura 6). O aumento da temperatura para 45°C, descrito como um dos principais estímulos à atividade do P_{gsiB} , levou à diminuição da detecção de GFP quando comparado ao crescimento sem estímulo, atingindo valores médios de apenas 30,4 ($\pm 2,3$) UAG (Figura 6). A adição de etanol (EtOH) na concentração de 6% ou 8% também desencadeou fenômeno semelhante, culminando com a detecção de valores médios de 39,3 ($\pm 2,0$) UAG e 29,7 ($\pm 1,5$) UAG, respectivamente (Figura 6). As condições para a atividade máxima desse sistema advieram dos cultivos na presença de concentrações de 6% ou 8% NaCl, os quais atingiram valores médios respectivos de 84,3 ($\pm 6,4$) UAG e 70,2 ($\pm 1,9$) UAG (Figura 6). Valores que embora numericamente distintos, demonstraram-se equivalentes após as análises estatísticas aplicadas (Figura 6).

Figura 6- Avaliação do desempenho da linhagem 1012 de *B.subtilis* albergando o plasmídeo pFGgsiB_GFP frente a diferentes condições de cultivo.

No eixo das ordenadas, estão dispostas as condições de cultivo empregadas e no das abscissas, a fluorescência detectada após quatro horas de crescimento. A fluorescência está expressa em unidades arbitrárias de GFP, a qual foi calculada a partir quociente entre a fluorescência obtida e a densidade ótica atingida por cada cultura nas diferentes condições de cultivo. A significância estatística das diferenças obtidas entre os grupos experimentais foi determinada por ANOVA e posterior teste de comparações múltiplas de Bonferroni, onde * indica $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. Os colchetes indicam as diferenças significativas entre os grupos. Os dados apresentados nesse gráfico são representativos de experimentos realizados em triplicata repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes. A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional *GraphPad Prism 5.0*. [EtOH] (%): Concentrações de etanol empregadas expressas em porcentagem, Δ (°C): Temperatura em graus Celsius empregada, quando não indicada, cultivo a 37 °C. [NaCl] (%): Concentrações de cloreto de sódio aplicadas expressas em porcentagem. [IPTG] mM: concentração de IPTG utilizada em milimolar. [IPTG] 0,5 mM: cultivo na presença de 0,5 mM de IPTG.

Como já foi descrito, o promotor P_{43} é passível de regulação pelos fatores σ^A , produzido na fase logarítmica de crescimento, e σ^B , sintetizado em condições de estresse. Por esse motivo, a linhagem FG43_GFP foi cultivada em condições normais de crescimento e submetida às diferentes condições de estresse empregadas para os outros dois sistemas de expressão descritos. O cultivo a 37 °C sob agitação, sem nenhum estímulo de estresse, resultou na máxima detecção de GFP para esse sistema, atingindo valores médios de 52,9 ($\pm 1,4$) UAG (Figura 7). O aumento da temperatura, a adição de NaCl ou Etanol em todas as concentrações testadas levaram a diminuição da detecção do gene alvo. Além disso, foi possível observar que a influência deletéria dos estímulos de estresse, operou de maneira

dose dependente, isto é, quanto mais austera a condição, menos GFP foi produzido (Figura 7). No caso do cultivo na presença de etanol, esse comportamento ficou mais evidente. Índices médios de 46,63 ($\pm 1,7$) UAG; 25,28 ($\pm 1,2$) UAG; 18,08 ($\pm 0,9$) UAG e 14,87 ($\pm 0,6$) foram detectados após crescimento na presença de 2%, 4%, 6% e 8% do referido álcool (Figura 7). Perfil semelhante foi observado após cultivo na presença de NaCl, onde se observou valores médios de 35,25 ($\pm 1,0$) UAG; 26,56 ($\pm 0,86$) UAG; 21,47 ($\pm 0,78$) UAG e 24,99 ($\pm 2,4$) UAG após o cultivo na presença do aludido sal nas concentrações de 2%, 4%, 6% ou 8%, respectivamente (Figura 7).

O sistema pFG43 mostrou-se funcional com o maior desempenho atingido após o crescimento em condições normais e sem a necessidade de estímulos. Por consequência, pode-se também afirmar que as modificações propostas para esse promotor (P_{43*}) com o intuito de aumentar a estabilidade do transcrito não inviabilizaram o funcionamento da sequência promotora. Outro fator relevante foi a observação de que, durante o crescimento logarítmico, situações adversas inibem o sistema de expressão a despeito da presença da região regulatória compatível como σ^B . Quando comparado ao sistema construído com base no promotor P_{gsiB} , o pFG43 possui a vantagem de não necessitar de nenhum indutor para atingir o seu desempenho máximo. No entanto, como já foi citado, o sistema pFGgsiB em sua melhor condição (adição de 6% ou 8% NaCl) atingiu valores médios acima dos 70 UAG, superando em aproximadamente 30% o pFG43 (Figuras 7 e 8). Apesar do desempenho inferior, apresenta-se a descrição de mais um sistema de expressão funcional em *B. subtilis*.

Figura 7- Avaliação do desempenho da linhagem 1012 de *B.subtilis* albergando o plasmídeo pFG43_GFP frente a diferentes condições de cultivo

No eixo das ordenadas, observam-se as condições de cultivo empregadas e no das abscissas, a fluorescência obtida após quatro horas de crescimento. A fluorescência está expressa em unidades arbitrárias de GFP, a qual foi calculada a partir quociente entre a fluorescência obtida e a densidade ótica atingida por cada cultura nas diferentes condições de cultivo. A significância estatística das diferenças obtidas entre os grupos experimentais foi determinada por ANOVA e posterior teste de comparações múltiplas de Bonferroni, onde * indica $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. Os colchetes indicam as diferenças significativas entre os grupos. Os dados apresentados nesse gráfico são representativos de experimentos realizados em triplicata repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes. A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional *GraphPad Prism 5.0*. [EtOH] (%): Concentrações de etanol empregadas expressas em percentagem. Δ (°C): Temperatura empregada em graus Celsius, quando não indicada, cultivo a 37 °C. [NaCl] (%): concentrações de cloreto de sódio aplicadas expressas em percentagem.

Apesar da funcionalidade dos sistemas de expressão representados pelos vetores pFG43 e PFGgsiB, o uso da GFP como repórter gera dificuldades para a comparação com outros sistemas de expressão desenvolvidos para *B.subtilis*. A maioria dos trabalhos que descreve vetores de expressão para esse hospedeiro emprega genes repórteres diferentes, principalmente a betagalactosidase e a alfa amilase em ensaios de atividade enzimática. Os pouquíssimos que utilizam GFP aplicam metodologias diversas das empregadas nesse trabalho ou utilizam versões diferentes de GFP. Esse conjunto de fatores impedem que o desempenho dos plasmídeos construídos seja comparado aos descritos pela literatura. Com

o intuito averiguar se os sistemas de expressão desenvolvidos no presente trabalho representavam uma alternativa promissora no campo da produção heteróloga em *B. subtilis*, realizou-se duas novas construções envolvendo os plasmídeos pHCMC02 (NGUYEN et al., 2005), o plasmídeo comercialmente disponível pHT01 (MoBiTec) e o mesmo gene repórter utilizado para a avaliação dos sistemas de expressão desenvolvidos por esse trabalho.

Ambos os plasmídeos controle foram tratados com as enzimas *BamHI* e *AatII* e submetidos a ligação com o gene que codifica para proteína GFP previamente tratado com as enzimas *BglII* e *AatII*, em estratégia equivalente à empregada para construção dos outros vetores produtores de GFP apresentados por esse trabalho. O plasmídeo pHCMC02 após a clonagem do gene repórter foi denominado de pHCMC02_GFP, enquanto que a clonagem do gene *gfp* no pHT01 deu origem ao plasmídeo pHT01_GFP (Figura 8). Novamente, as construções foram confirmadas por análises de restrição e de sequenciamento, como foi descrito nos materiais e métodos. Os dois plasmídeos são derivados do pMTLBS72 (TITOK et al., 2003) e além de compartilharem a mesma origem de replicação, o número intermediário de cópias por célula, detêm as mesmas marcas de seleção; cloranfenicol, funcional em bactérias gram-positivas e ampicilina, ativo em bactérias gram-negativas (Figura 8). O pHCMC02_GFP possui a expressão de GFP sob o controle do promotor constitutivo de *B. subtilis* P_{lepA} , ao passo que no sistema comercial a produção do gene repórter fica a cargo do promotor induzível por IPTG, o P_{grac} (Figura 8). A transformação da linhagem 1012 de *B. subtilis* com os plasmídeos controle pHCMC02_GFP e pHT01_GFP deram origem, respectivamente, as cepas HCMC02_GFP e HT01_GFP (Quadro 2).

Figura 8- Desenho esquemático dos dois plasmídeos utilizados como controle para expressão de GFP

Os dois plasmídeos, assim como o pHCMC03 (descrito na figura 1), são derivados do pMTLBS72 (TITOK et al., 2003) e compartilham a mesma origem de replicação e cassetes de resistência; ampicilina (Amp), funcional em bactérias gram-negativas e cloranfenicol (Cm), ativo em gram-positivas. O gene que codifica para proteína GFP encontra-se destacado em verde. (A) pHCMC02_GFP: Destaque para o promotor constitutivo *P_{lepA}*, em azul, que dirige a expressão do gene alvo. (B) pHT01_GFP: destaques para o promotor *P_{grac}*, em azul, induzível por IPTG e para o gene *lacI* que codifica para proteína de mesmo nome, responsável pela repressão do promotor *P_{grac}* na ausência do indutor.

Apesar de o promotor *P_{lepA}* ser descrito como constitutivo e regulado pelo fator sigma A (σ^A), o desempenho da linhagem HCMC02_GFP foi também avaliada nas mesmas situações de estresse empreendidas para os outros sistemas apresentados. A aplicação desses estímulos visou validar o ensaio de detecção e fornecer um relato do comportamento do plasmídeo descrito por Nguyen e colaboradores(2005) em outras condições de cultivo. Durante a execução dos ensaios envolvendo o derivados do plasmídeo pHCMC02, observou-se que a linhagem contendo apenas o plasmídeo vazio desencadeava detecção significativa de GFP. Devido a essa característica e com intuito de facilitar a visualização gráfica dos resultados, os dados aqui representados foram previamente subtraídos dos encontrados com a linhagem de

B.subtilis albergando o plasmídeo vazio (HCMC02). As condições para detecção máxima de GFP nesse sistema foram o cultivo em condições ordinárias ($0,47 \pm 0,01$ UAG), à temperatura de 45 °C ($0,39 \pm 0,08$) ou na presença de 2% de etanol ($0,6173 \pm 0,05$) (Figura 9). Valores que,

apesar de distintos, demonstraram-se equivalentes após a realização dos testes estatísticos de ANOVA e Bonferroni.

Figura 9- Avaliação do desempenho da linhagem 1012 de *B.subtilis* albergando o plasmídeo pHCMC02_GFP frente a diferentes condições de cultivo.

No eixo das ordenadas, observam-se as condições de cultivo empregadas e no das abscissas, a fluorescência obtida após quatro horas de crescimento. A fluorescência está expressa em unidades arbitrárias de GFP, a qual foi calculada a partir do quociente entre a fluorescência obtida e a densidade ótica atingida por cada cultura nas diferentes condições de crescimento. A significância estatística das diferenças obtidas entre os grupos experimentais foi determinada por ANOVA e posterior teste de comparações múltiplas de Bonferroni, onde * indica $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. Os valores apresentados nesse gráfico foram previamente subtraídos dos índices de detecção encontrados após o crescimento da linhagem de *B.subtilis* com o plasmídeo pHCMC02 vazio (sem o gene alvo). Os colchetes indicam as diferenças significativas entre os grupos. Os dados apresentados nesse gráfico são representativos de experimentos realizados em triplicata repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes. A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional *GraphPad Prism 5.0*. [EtOH] (%): concentrações de etanol empregadas expressas em percentagem. [NaCl] (%): Concentrações de cloreto de sódio aplicadas expressas em percentagem. Δ (°C): Temperatura em graus Celsius empregada, quando não indicada, cultivo a 37 °C.

A linhagem de *B.subtilis* transformada com o plasmídeo pHT01_GFP foi inicialmente avaliada na presença de diferentes concentrações IPTG (indutor), as quais variaram em 0,1 mM e 1mM. Todas as concentrações de IPTG aplicadas levaram ao aumento da detecção de GFP, quando comparas ao cultivo na ausência do indutor (Figura 10A). Valores médios de 59,09($\pm$ 3,3) UAG; 80,44 ($\pm$ 4,5) UAG; 101,6 ($\pm$ 5,9) UAG e 96,53 ($\pm$ 9,7) UAG foram obtidos, respectivamente, após o cultivo por quatro horas na presença de 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5mM ou 1 mM de IPTG (Figura 10A). A detecção de GFP foi proporcional à quantidade de indutor adicionada até a concentração de 0,5 mM e não houve diferença significativa entre os valores atingidos com essa concentração e os alcançados na presença de 1 mM de IPTG (Figura 10A).

Uma vez que o promotor P_{grac} é derivado do promotor de GroEL, uma chaperona produzida principalmente em situações de estresse térmico, resolveu-se testar o desempenho desse sistema com estímulo duplo: a adição de IPTG (0,5 mM) aplicada juntamente ao cultivo em situações de estresse. No entanto, a aplicação dos estímulos adicionais à presença do IPTG levou à diminuição da detecção de GFP (Figura 10B). O aumento da temperatura para 45 °C resultou redução leve da detecção do repórter atingindo valores médios de 86,38 ($\pm$ 2,3) UAG. Por outro lado, o cultivo nas outras situações de estresse revelaram-se bastante deletérias à atividade desse sistema, atingindo valores médios que variaram entre 38,5 $\pm$ 0,1 UAG (2% EtOH) e 5,9 $\pm$ 0,4 UAG (8% NaCl) (Figura 10B). Isso indica que a melhor condição para o sistema comercial é o cultivo com a adição de IPTG nas concentrações de 0,5mM ou 1 mM (Figura 10).

A redução da detecção de GFP nas situações de estresse foi observada de forma gradativa, em fenômeno semelhante ao ocorrido para o sistema pFG43. O crescimento na presença de etanol nas concentrações de 2%, 4% e 6% atingiram níveis médios de 38,45 ($\pm$ 0,14) UAG; 15,03 ($\pm$ 0,23) UAG e 8,61 ($\pm$ 0,23) UAG, respectivamente (Figura 10B). No caso do cultivo na presença de NaCl, a redução gradativa na atividade de GFP manteve-se até a máxima concentração testada (8%). Valores médios de 28,99($\pm$ 0,76) UAG; 21,80 ($\pm$ 1,29) UAG; 14,10($\pm$ 0,48) UAG e 5,19 ($\pm$ 0,20) UAG foram atingidos, respectivamente, após o cultivo sob concentrações de cloreto de sódio de 2%, 4%, 6% ou 8% (Figura 10B).

Figura 10- Avaliação do desempenho da linhagem 1012 de *B.subtilis* albergando o plasmídeo pHT01_GFP frente a diferentes condições de cultivo.

No eixo das ordenadas, observam-se as condições de cultivo empregadas e no das abscissas, a fluorescência detectada após quatro horas de crescimento. (A) Cultivo na presença de diferentes concentrações de IPTG. (B) Cultivo em estímulo duplo: 0,5 mM de IPTG e diferentes condições de estresse. A fluorescência está expressa em unidades arbitrárias de GFP, a qual foi calculada a partir do quociente entre a fluorescência obtida e a densidade ótica atingida por cada cultura nas diferentes condições de cultivo. A significância estatística das diferenças obtidas entre os grupos experimentais foi determinada por ANOVA e posterior teste de comparações múltiplas de Bonferroni, onde * indica $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. Os colchetes indicam as diferenças significativas entre os grupos. Os dados apresentados nesse gráfico são representativos de experimentos realizados em triplicata repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes. A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional *GraphPad Prism 5.0*. [EtOH] (%): Concentrações de etanol empregadas expressas em percentagem. Δ (°C): Temperatura empregada em graus Celsius, quando não indicada cultivo a 37 °C. [NaCl] (%): Concentrações de cloreto de sódio aplicadas expressas em percentagem. [IPTG] mM: concentração de IPTG utilizada em milimolar. [IPTG] 0,5 mM: emprego de 0,5 mM de IPTG.

Os dados apresentados até agora mostram que os dois sistemas de expressão desenvolvidos nesse trabalho, o pFG43 ($52,9 \pm 1,4$ UAG) e o pFGgsiB ($84,3 \pm 6,4$ UAG), são pelo menos cinquenta vezes mais potentes que o plasmídeo controle pHCMC02 ($0,6173 \pm 0,05$ UAG) (Figura 11). O plasmídeo pFGgsiB e o comercial pHT01 ($96,53 \pm 9,7$ UAG) mostraram-se cerca de duas vezes mais eficientes do que o pFG43 (Figura 11). Apesar da diferença numérica apresentada entre os valores obtidos para o sistema comercial e o pFGgsiB, as análises estatísticas aplicadas apontam para desempenho equivalente entre os dois sistemas (Figura 11).

Figura 11- Análise comparativa do desempenho dos sistemas de expressão empregados após quatro horas de crescimento.

No eixo das ordenadas, observam-se as melhores condições de cultivo empregadas para cada sistema e no das abscissas, a fluorescência detectada após quatro horas de crescimento. A fluorescência está expressa em unidades arbitrárias de GFP, a qual foi calculada a partir quociente entre a fluorescência obtida e a densidade ótica atingida por cada cultura nas diferentes condições de crescimento. A significância estatística das diferenças obtidas entre os grupos experimentais foi determinada por ANOVA e posterior teste de comparações múltiplas de Bonferroni, onde * indica $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. Os colchetes indicam as diferenças significativas entre os grupos. Os dados apresentados nesse gráfico são representativos de experimentos realizados em triplicata repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes. A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional *GraphPad Prism 5.0*. 37°C: Cultivo a essa temperatura sem nenhum estímulo de estresse. [NaCl] 6%: cultivo a 37°C na presença de 6% de cloreto de sódio. [IPTG] 1 mM: crescimento a 37°C na presença 1 mM de IPTG.

Como foi descrito no item materiais e métodos, os ensaios de detecção de GFP nas linhagens construídas foram iniciados a partir de um pré-inóculo crescido durante uma noite. Durante a repetição dos ensaios, observou-se que essas culturas, sobretudo as oriundas do sistema pFG43 e pFGgsiB, sempre se apresentavam com uma coloração verde intensa quando observadas apenas por iluminação natural (dados não mostrados). Esse fato motivou a quantificação da atividade de GFP após uma noite (aproximadamente 16 horas) de cultivo a 37 °C. De fato, o cultivo por uma noite de todas as linhagens testadas levou a um incremento na detecção de GFP quando comparados ao crescimento após quatro horas (Figuras 11 e 12). A linhagem albergando o plasmídeo pHCMC02_GFP perfez valores médios de 1,79 ($\pm 0,11$), os quais superam, em aproximadamente quatro vezes, os resultados obtidos após quatro horas de crescimento (0,47 UAG) (Figuras 11 e 12). As linhagens FG43_GFP e FGgsiB_GFP propostas por esse trabalho atingiram, respectivamente, valores de 194 ($\pm 8,38$) UAG e 239 ($\pm 10,8$) UAG, os quais representam aproximadamente o triplo dos índices detectados após quatro horas de cultivo (52,9 UAG e 84,3 UAG) (Figuras 11 e 12).

A incubação prolongada mostrou ainda que ambos os sistemas desenvolvidos no presente trabalho foram superiores ao plasmídeo comercial pHT01 ($129,7 \pm 6,38$ UAG) no tocante a detecção do gene repórter GFP (Figura 12). Apesar de os dois referidos sistemas apresentarem valores médios diversos, os testes estatísticos demonstraram equivalência nos índices de detecção de GFP (Figura 12). Vale destacar ainda que as linhagens que albergavam os plasmídeos pFG43_GFP e pFGgsiB_GFP foram cultivadas durante esse período sem nenhum indutor, enquanto a linhagem HT01_GFP multiplicou-se na presença de IPTG.

Figura 12-Influência do cultivo por uma noite (16 horas) no desempenho dos sistemas de expressão testados.

No eixo das ordenadas, estão indicadas as linhagens produtoras de GFP utilizadas e no das abscissas, a fluorescência detectada. A fluorescência está expressa em unidades arbitrárias de GFP, a qual foi calculada a partir quociente entre a fluorescência obtida e a densidade ótica atingida por cada cultura após o crescimento por 16 horas. A significância estatística das diferenças obtidas entre os grupos experimentais foi determinada por ANOVA e posterior teste de comparações múltiplas de Bonferroni, onde * indica $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. Os colchetes indicam as diferenças significativas entre os grupos. Os dados apresentados nesse gráfico são representativos de experimentos realizados em triplicata repetidos pelo menos três vezes com resultados semelhantes. A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional *GraphPad Prism 5.0*.

Com o objetivo de confirmar os dados obtidos relativos ao desempenho dos plasmídeos construídos, decidiu-se avaliar a produção de GFP por outra metodologia. A citometria de fluxo permite avaliar a fluorescência emitida por células de modo mais sensível e fidedigno quando comparada a luminometria. Isso é possível porque eventos individuais (célula à célula) são analisados, fornecendo não só uma medida da fluorescência bruta de uma população, bem como a contribuição de cada célula para o montante final. Outra vantagem é que essa técnica dispensa o monitoramento de densidade ótica como estimativa do número de células analisadas, procedimento suscetível a erros e imprecisões devido ao tamanho diferente das células bacterianas durante crescimentos prolongados.

O primeiro ensaio utilizando citometria de fluxo propôs-se a avaliar o melhor desempenho atingido pelos plasmídeos testados, o crescimento por uma noite. Inicialmente, determinou-se a fluorescência natural das linhagens de *B. subtilis* empregando a linhagem controle FG20 a qual demonstrou histograma concentrado na primeira potência de fluorescência detectada (10^1) (Figura 13A). A linhagem HT01_GFP, demonstrou uma população celular com intensidade de fluorescência bem heterogênea, distribuindo-se entre 10^2 e 10^4 (Figura 13B). Por outro lado, as linhagens FG43_GFP e FGgsiB_GFP apresentaram perfis mais homogêneos de detecção, os quais se encontraram majoritariamente distribuídos entre as intensidades 10^3 e 10^4 (Figura 13 C e D). A sobreposição normalizada dos quatro histogramas obtidos realça a semelhança entre o desempenho dos dois plasmídeos construídos nesse trabalho, bem como destaca a superioridade destes frente ao sistema de expressão comercial (Figura 13E). Outra maneira de comparar o desempenho dos sistemas de expressão por citometria é a verificação da fluorescência média detectada em cada cultura. A linhagem controle (FG20) atingiu fluorescência média de $6,18 (\pm 1,8)$, enquanto que os sistemas pHT01, pFG43 e pFGgsiB promoveram a detecção média de $832,3 (\pm 101,0)$, $1.471 (\pm 175,7)$ e $1.553 (\pm 125,9)$, respectivamente (Figura 13F). Como pode ser observado na mesma figura, os valores de fluorescência média atingidos pelos dois sistemas desenvolvidos nesse trabalho são equivalentes entre si e superiores aos encontrados após a análise da produção do gene repórter dirigida pelo plasmídeo pHT01_GFP. Esses dados corroboram os achados obtidos por luminometria e atestam o desempenho superior dos plasmídeos pFG43 e pFGgsiB frente ao plasmídeo comercial pHT01.

Figura 13- Análise por citometria de fluxo do desempenho dos plasmídeos construídos frente ao vetor comercial pHT01 após 16 horas de cultivo.

Para os gráficos (A) até (E): No eixo das abscissas estão representados os números de células, enquanto que no das ordenadas, a intensidade de fluorescência detectada utilizando o filtro para isotiocianato de fluoresceína (FITC) após a excitação/detecção a 488 nm e 530 nm, respectivamente. (A) Histograma obtido após a análise de células da linhagem de *B. subtilis* FG20 (controle negativo), (B) Histograma obtido após a análise de células da linhagem HT01_GFP. (C) Histograma obtido após a análise de células da linhagem FG43_GFP. (D) Histograma obtido após a análise de células da linhagem FGgsiB_GFP, (E) Disposição normalizada dos histogramas obtidos e (F) Média de intensidade de fluorescência detectada após a análise das linhagens FG20, HT01_GFP, FG43_GFP, FGgsiB_GFP. No gráfico (F), a abscissa representa a média de fluorescência detectada, enquanto o eixo y elenca as linhagens utilizadas. Os dados apresentados nessa figura foram obtidos utilizando o equipamento FACSCalibur com posterior análise nos programas computacionais *Flowjo 10* e *Graph pad Prism 5.0* e são representativos de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. A significância estatística das diferenças obtidas entre os grupos experimentais foi determinada por ANOVA e posterior teste de comparações múltiplas de Bonferroni, onde * indica $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. Os colchetes indicam as diferenças significativas entre os grupos.

Os altos níveis de expressão gênica caracterizam os sistemas de expressão heteróloga eficientes. No entanto, a manutenção da produção heteróloga ao longo das gerações é um atributo importante, sobretudo em períodos de incubação longos. Na maioria dos sistemas, assim como nos utilizados nesse trabalho, essa estabilidade é garantida pela presença de genes para resistência a antibióticos junto à informação heteróloga. Dessa forma a adição da droga correspondente força a manutenção da informação heteróloga ao longo das gerações. Embora o sistema proposto detenha o gene de resistência à tetraciclina como marca de seleção, decidiu-se avaliar o impacto da remoção da pressão seletiva na produção de GFP. Esses experimentos visaram fornecer uma medida indireta da estabilidade plasmidial sem a presença de pressão seletiva (estabilidade segregacional).

Como descrito nos materiais e métodos as linhagens contendo os plasmídeos pFG20, pFG43_GFP e pFGgsiB_GFP foram crescidas durante uma noite com ou sem tetraciclina e a produção de GFP foi detectada por citometria de fluxo. Nos experimentos envolvendo a linhagem FGgsiB_GFP, observou-se bastante semelhança entre o perfil de detecção de GFP após o cultivo com ou sem a pressão seletiva (Figura 14 B e C). A disposição normalizada dos histogramas obtidos evidenciou uma sobreposição quase que absoluta entre as curvas obtidas, demonstrando que a presença do antibiótico é irrelevante para a expressão máxima desse sistema (Figura 14D). A média de intensidade de fluorescência detectada após cultivo dessa linhagem com e sem antibiótico corresponderam, respectivamente, a 1.820 ($\pm 68,30$) e 1.553 ($\pm 125,9$) (Figura 14D). Valores que, embora numericamente distintos, revelaram-se equivalentes perante aos testes estatísticos realizados (Figura 14D). Esse conjunto de dados demonstra que a ausência da pressão seletiva não prejudica o desempenho do sistema construído e fornece uma evidência indireta da estabilidade do pFGgsiB por pelo menos um noite de crescimento sem pressão seletiva.

Ensaio realizado com a linhagem FG43_GFP, que alberga o outro sistema de expressão desenvolvido nesse trabalho, apresentaram resultados semelhantes aos encontrados para linhagem FG43_GFP. Os histogramas correspondentes ao crescimento com ou sem pressão seletiva estão majoritariamente localizados entre os níveis de expressão 10^3 e 10^4 (Figura 15 B e C). A sobreposição normalizada das curvas ilustra melhor a identidade no perfil de detecção do repórter entre os cultivos com ou sem tetraciclina (Figura 15D). Por fim, as análises dos dados de média de fluorescência confirmaram que

presença da droga é indiferente para produção máxima de GFP pela linhagem FG43_GFP. O cultivo sem a pressão seletiva resultou em 1.268 ($\pm 160,3$) e o crescimento com tetraciclina, 1.166 ($\pm 82,81$). Em suma, os dois sistemas de expressão construídos durante esse trabalho, além de promoverem altos níveis de expressão, possuem estabilidade segregacional por pelo menos uma noite de cultivo.

Figura 14- Influência da pressão seletiva (antibiótico) no desempenho do sistema de expressão pFGsiB após 16 horas de cultivo

Para os gráficos (A) até (D): No eixo das abscissas estão representados os números de células, enquanto que no das ordenadas, a intensidade de fluorescência detectada utilizando o filtro para isotiocianato de fluoresceína (FITC) após a excitação/detecção a 488 nm e 530 nm, respectivamente. (A) Histograma obtido após a análise de células da linhagem de *B. subtilis* FG20 (controle negativo). (B) Histograma obtido após a análise de células da linhagem FGgsiB_GFP cultivadas sem pressão seletiva. (C) Histograma obtido após a análise de células da linhagem FGgsiB_GFP cultivadas na presença de tetraciclina. (D) Disposição normalizada dos histogramas obtidos. (E) Fluorescência média detectada após o cultivo com ou sem tetraciclina da linhagem FGgsiB_GFP. No gráfico (E), a abscissa representa a média de fluorescência detectada, enquanto o eixo x elenca as linhagens/condições utilizadas. Os dados ilustrados nessa figura foram obtidos utilizando o equipamento FACSCalibur com posterior análise nos programas computacionais *Flowjo 10.0* e *Graph pad Prism 5.0* e são representativos de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. A significância estatística das diferenças obtidas entre os grupos experimentais foi determinada por ANOVA e posterior teste de comparações múltiplas de Bonferroni, onde * indica $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os colchetes indicam as diferenças significativas entre os grupos. S/A: Cultivo durante uma noite sem antibiótico. Tet: Cultivo durante uma noite na presença de 10 μ g/mL de tetraciclina.

Figura 15- Influência da pressão seletiva (antibiótico) no desempenho do sistema de expressão pFG43 após 16 horas de cultivo.

Para os gráficos (A) até (D): no eixo das abscissas estão representados os números de células, enquanto que no das ordenadas, a intensidade de fluorescência detectada utilizando o filtro para isotiocianato de fluoresceína (FITC) após a excitação/detecção a 488 nm e 530 nm, respectivamente. (A) Histograma obtido após a análise de células da linhagem de *B. subtilis* FG20 (controle negativo). (B) Histograma obtido após a análise de células da linhagem FG43_GFP cultivadas sem pressão seletiva. (C) Histograma obtido após a análise de células da linhagem FG43_GFP cultivadas na presença de tetraciclina. (D) Disposição normalizada dos histogramas obtidos. (E) Fluorescência média detectada após o cultivo com ou sem tetraciclina da linhagem FG43_GFP. No gráfico (E), a abscissa representa a média de fluorescência detectada, enquanto o eixo x elenca as linhagens/condições utilizadas. Os dados ilustrados nessa figura foram obtidos utilizando o equipamento FACSCalibur com posterior análise nos programas computacionais *Flowjo 10.0* e *Graph pad Prism 5.0* e são representativos de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. A significância estatística das diferenças obtidas entre os grupos experimentais foi determinada por ANOVA e posterior teste de comparações múltiplas de Bonferroni, onde * indica $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. Os colchetes indicam as diferenças significativas entre os grupos. S/A: Cultivo durante uma noite sem antibiótico. Tet: Cultivo durante uma noite na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ de tetraciclina.

Como foi citado no início dessa seção, as construções envolvendo a inserção dos promotores no cerne do plasmídeo pHCMC03 (Figura 1) foram abandonadas devido à alta instabilidade estrutural observada durante essas clonagens. No entanto, a inserção de outros genes sem a remoção do promotor ocorre com relativo sucesso no nosso laboratório. A construção de uma versão desse plasmídeo capaz de produzir GFP nos permitiria compará-lo aos sistemas construídos, bem como, avaliar o efeito do arcabouço plasmidial na expressão gênica, uma vez que o plasmídeo pFGgsiB contempla o mesmo promotor que dirige a expressão do pHCMC03, o P_{gsiB} .

A construção foi obtida a partir da inserção do gene *gfp* nos sítios de *BamHI* e *AatII* do plasmídeo pHCMC03. A clonagem transcorreu com sucesso sem a observação de instabilidade durante a seleção dos clones positivos e a integridade do repórter foi confirmada por análises de restrição e sequenciamento (dados não mostrados). O plasmídeo construído foi denominado de pHCMC03_GFP e a linhagem 1012 de *B.subtilis* que o alberga, de HCMC03_GFP (Quadro 2). Devido a maior facilidade e exatidão, a citometria de fluxo foi utilizada na análise do desempenho desse plasmídeo.

Após o crescimento por 16 horas (uma noite), culturas das linhagens HCMC03_GFP e FGgsiB_GFP foram analisadas para produção de GFP no equipamento FACSCalibur, conforme descrito nos materiais e métodos. A linhagem HCMC03_GFP mostrou-se funcional com perfil de fluorescência concentrada entre as potências 10^1 e 10^2 o que indica que dentro dessa população há células que apresentaram detecção semelhante ao controle negativo e outras que realmente produzem o gene alvo (Figura 16 A E B). Embora funcional, esse sistema apresentou desempenho bastante inferior ao pFGgsiB. Como já foi citado, esse último alcançou fluorescência média de 1.166 ($\pm 82,81$), enquanto o recém descrito plasmídeo atingiu apenas 63,0 ($\pm 8,13$). Diante do exposto, os resultados obtidos nesse experimento sugerem que o melhor desempenho do sistema pFGgsiB frente ao pHCMC03 está ligado aos efeitos do arcabouço plasmidial.

Figura 16- Efeito do arcabouço plasmidial no desempenho do promotor P_{gsiB} .

Para os gráficos (A) até (D): No eixo das abscissas estão representados os números relativos de células, enquanto que no das ordenadas, a intensidade de fluorescência detectada utilizando o filtro para isotiocianato de fluoresceína (FITC) após a excitação/detecção a 488 nm e 530 nm, respectivamente. (A) Histograma obtido após a análise de células da linhagem de *B. subtilis* FG20 (controle negativo). (B) Histograma obtido após a análise de células da linhagem de *B. subtilis* HCMC03_GFP. (C) Histograma obtido após a análise de células da linhagem de *B. subtilis* FGgsiB_GFP. (D) Disposição normalizada dos histogramas obtidos. (E) Média de intensidade de fluorescência detectada após a análise das linhagens FG20, FGgsiB_GFP e HCMC03_GFP. No gráfico (E), a abscissa representa a média de fluorescência detectada, enquanto o eixo x elenca as linhagens utilizadas. Os dados ilustrados nessa figura foram obtidos utilizando o equipamento FACSCalibur com posterior análise nos programas computacionais *Flowjo 10.0* e *Graph pad Prism 5.0* e são representativos de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. A significância estatística das diferenças obtidas entre os grupos experimentais foi determinada por ANOVA e posterior teste de comparações múltiplas de Bonferroni, onde * indica $p < 0,05$, **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. Os colchetes indicam as diferenças significativas entre os grupos.

Como foi mostrado nos resultados apresentados até o momento, diferentes perfis de expressão foram observados para os plasmídeos testados. No intuito de visualizar diretamente esse fenômeno e relacioná-los aos dados obtidos, decidiu-se observar por microscopia de fluorescência as linhagens construídas durante esse trabalho. Para tal fim, as linhagens recombinantes de *B.subtilis* capazes de produzir GFP foram crescidas por uma noite e submetidas a visualização em microscópio como descrito na sessão materiais e métodos.

Inicialmente, foram analisadas as linhagens albergando plasmídeos derivados do pHCMC03. Como pode ser observado na figura 17, todas as linhagens desse grupo apresentaram o formato característico de *B.subtilis*, bactérias em forma de bacilo relativamente curto e espesso. Como esperado, não se detectou atividade de GFP na linhagem com o plasmídeo vazio (pHCMC03) e células positivas para GFP foram observadas na análise das linhagens HCMC03_GFP e HT01_GFP. Grande parte das células albergando o plasmídeo HCMC03_GFP mostrou-se negativa para detecção de GFP e, além disso, a observação de diferentes intensidades de fluorescência foi comum após a visualização de diferentes campos. Acontecimento semelhante, embora menos contundente, foi observado para a cultura albergando o plasmídeo comercial pHT01. Nesse último caso, a produção de GFP foi maior, mas ainda foi possível observar células não produtoras do gene repórter, assim como diferentes intensidades da atividade de GFP. Essas características estão de acordo com os dados obtidos por citometria, os quais indicaram uma população heterogênea no que concerne a detecção de GFP para as duas linhagens citadas.

No caso das linhagens albergando derivados do pFG20, observou-se uma alteração na forma das linhagens de *B.subtilis*. Como pode ser observado na figura 18, as linhagens em questão assumiram um aspecto mais alongado e fino quando comparado ao observado para as cepas albergando derivados do plasmídeo pHCMC03. Além disso, houve a formação de filamentos celulares, levando a crer que as células continuam ligadas após a divisão celular ou possuem tendência à agregação. Acredita-se que esse aspecto seja devido ao cassete de resistência à tetraciclina, o qual codifica para uma proteína transmembrana que opera a extrusão da droga para o meio extracelular. Tal assertiva baseia-se no fato de que esse fenômeno foi observado tanto nas linhagens produtoras de GFP, quanto na linhagem que possui apenas o plasmídeo vazio (FG20). Além disso, o mesmo fenômeno fora observado ao se cultivar essas linhagens na ausência de tetraciclina, apontando que a alteração da forma

celular não é devido ao efeito tóxico dessa droga (dados não mostrados). Como já foi visto, a alteração morfológica não impediu o alto desempenho dessas linhagens recombinantes na produção de GFP.

As células derivadas da linhagem FG43_GFP apresentaram a maior detecção de GFP desse ensaio (Figuras 18 e 19). Além disso, a expressão do gene alvo nessa linhagem demonstra-se ser mais constante, uma vez que a grande maioria das células analisadas apresenta fluorescência ao serem excitadas com luz no comprimento de onda adequado (Figura 19). Esses achados estão de acordo com os dados obtidos após a realização da citometria de fluxo que apontaram para uma população homogênea no tocante aos índices de fluorescência detectados. A atividade de GFP foi também observada na linhagem FGgsiB_GFP. À semelhança do que foi encontrado com a linhagem FG43_GFP, grande parte das células analisadas apresenta atividade de GFP e não houve grande variação na intensidade do sinal detectado. A diferença entre os dois sistemas na análise microscópica surge quando comparamos a intensidade da atividade de GFP, a qual é mais proeminente na linhagem FG43_GFP. Esse dado vai de encontro aos obtidos com a citometria de fluxo e luminometria os quais descrevem os sistemas pFGgsiB e pFG43 como equivalentes.

Figura 17- Análise em microscopia de fluorescência das linhagens de *B.subtilis* albergando plasmídeos derivados do pHCMC03.

As imagens foram obtidas em microscópio de contraste de fase (EVOS fl, AMG) utilizando as recomendações do fabricante para detecção de GFP. As ilustrações demonstradas nessa figura são representativas de pelo menos dez campos analisados para cada linhagem.

Figura 18- Análise em microscopia de fluorescência das linhagens de *B.subtilis* albergando plasmídeos derivados do pFG20.

As imagens foram obtidas em microscópio de contraste de fase (EVOS fl, AMG) utilizando as recomendações do fabricante para detecção de GFP. As ilustrações demonstradas nessa figura são representativas de pelo menos dez campos analisados para cada linhagem.

Com o objetivo de investigar a contradição gerada pela discordância dos dados de citometria e microscopia de fluorescência com relação aos dois sistemas de expressão desenvolvidos durante esse trabalho, decidiu-se utilizar outra maneira de observar a produção heteróloga. A disposição das proteínas bacterianas totais em gel de SDS-PAGE fornece uma evidência direta do montante de proteína heteróloga produzida por cada sistema. Extratos de lisados celulares cultivados por quatro ou 16 horas das principais linhagens produtoras de GFP construídas durante esse trabalho foram submetidos à técnica de SDS-PAGE. Após a coloração do gel obtido com *comassie blue*, observou-se que apenas o extrato correspondente a linhagem FG43_GFP cultivada por uma noite apresentou uma banda evidente no gel compatível ao tamanho esperado para a proteína GFP (29 kDa). Esse resultado está de acordo com os achados de microscopia, onde se observa a maior produção de GFP por parte da linhagem albergando o plasmídeo pFG43_GFP, mas vai de encontro aos dados observados na luminometria e na citometria de fluxo. Acredita-se, portanto, que ambas as metodologias não foram capazes de discernir a superioridade do sistema pFG43 frente ao sistema pFGgsiB atestada pelos ensaios de microscopia e de SDS-PAGE.

Figura 19-Avaliação da produção de GFP pelos sistemas de expressão construídos em SDS-PAGE.

Amostras: 1- Padrão de massa molecular, 2- Extrato da linhagem FG20 (controle negativo) cultivada por 16 horas, 3- Extrato da linhagem FG20 (controle negativo) cultivada por 4 horas, 4- Extrato da linhagem FG43_GFP cultivada por 16 horas, 5- Extrato da linhagem FG43_GFP cultivada por 4 horas, 6- Extrato da linhagem FGgsiB_GFP cultivada por 16 horas, 7- Extrato da linhagem FGgsiB_GFP cultivada por 16 horas e 8- Extrato da linhagem HT01_GFP cultivada por 16 horas, 9- Extrato da linhagem HT01_GFP cultivada por 4 horas.

No intuito de por a prova o desempenho dos sistemas de expressão construídos durante esse trabalho, propôs-se a inserção de um novo gene heterólogo nos sistemas de expressão construídos. Para esses experimentos, utilizou-se o gene que codifica para proteína híbrida gDE7. Vale destacar que a expressão desse gene jamais fora observada ao empregarmos os sistemas de expressão disponíveis no laboratório, tampouco os plasmídeos comerciais derivados do pHT01 (CAVALCANTE, 2008 e dados não mostrados). O referido gene teve seus códons adaptados para expressão em *B. subtilis* e foi adquirido na forma de um plasmídeo denominado pBSK-gDE7b da empresa GenScript (Figura 20A). O fragmento gênico correspondente a proteína gDE7 foi obtido a partir da digestão do referido plasmídeo com as enzimas *BamHI* e *XbaI* e submetido a reações de ligação com o plasmídeo pFGgsiB previamente tratados com as mesmas enzimas.

A clonagem do gene híbrido no plasmídeo pFGgsiB foi confirmada por análises de restrição e sequenciamento, dando origem ao plasmídeo pFGgsiB_gDE7b (Figura 20B). Em seguida, a linhagem 1012 de *B.subtilis* foi transformada com o plasmídeo recém construído, dando origem a linhagem FGgsiB_gDE7.

Após o crescimento por uma noite, culturas de diferentes clones da linhagem FGgsiB_gDE7 foram submetidos a ensaios de *western blot* com anticorpos específicos contra a proteína híbrida gDE7. Todos os clones de *B.subtilis* testados foram capazes de produzir a proteína gDE7 em níveis detectáveis (Figura 20). Assim, demonstramos que o nosso sistema de expressão presta-se não só à expressão de genes repórteres, mas e, sobretudo, à produção de proteínas-desafio para *B.subtilis*. Os dados obtidos com os plasmídeos derivados do pFG20 foram organizados na forma de um manuscrito a ser submetido à publicação.

Figura 20- Construção de linhagens de *B.subtilis* capazes de produzir a proteína híbrida gDE7.

(A) Desenho esquemático do plasmídeo pBSK-gDE7b adquirido da GenScript contendo o gene sintético híbrido *gDE7b*, o qual teve seus códons adaptados para expressão em *B.subtilis*. (B) Desenho esquemático do plasmídeo pFGgsiB_gDE7 construído para testar a funcionalidade do novo sistema de expressão. Destaque para o gene *gDE7b* destacado em verde nos dois plasmídeos e para o promotor *P_{gsiB}*, destacado em azul na ilustração (B). (C) Imunodetecção *in vitro* realizada a partir de diferentes clones de *B.subtilis* albergando o plasmídeo pFGgsiB_gDE7. **Amostras:** 1-5 diferentes clones de *B.subtilis* obtidos após a transformação com o plasmídeo pFGSI_gDE7, 6- *B.subtilis* 1012 e 7- proteína gD produzida a partir de linhagens recombinantes de *E.coli*. Ensaio realizado com anticorpos policlonais anti-gD.

Conforme foi citado durante a introdução, também empregou-se um promotor derivado do *P_{mrgA}*. Para que esse promotor fosse avaliado em *B.subtilis*, obteve-se o promotor e o gene repórter do plasmídeo original pBBpameGFP (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010) (Figura 21A) e procedeu-se a clonagem do mesmo no cerne do plasmídeo pHCMC03, dando origem ao plasmídeo pHCMRGA_GFP (Figura 21B). Antes de avaliar a expressão desse plasmídeo em *B.subtilis*, realizou-se ensaio para verificação da expressão *in vitro* em *E.coli*. Após o crescimento por uma noite em placa de petri, as linhagens de *E.coli* transformadas com o plasmídeo pHCMRGA_GFP foram submetidas à irradiação por luz ultravioleta em um transluminador e a imagem gerada foi captada por fotografia. Como

esperado, obteve-se luminescência em todos os clones de *E.coli* testados (Figura 21C), demonstrando a funcionalidade do sistema construído nesse hospedeiro. Em seguida, linhagens de *B.subtilis* 1012 foram transformadas com o mesmo plasmídeo, originando a linhagem BSMRGA_GFP. Ensaio semelhante ao realizado com as linhagens recombinantes *E.coli* revelou que a produção de GFP por parte da linhagem BSMRGA_GFP ficou abaixo dos níveis detectáveis (dados não mostrados). Uma vez que o promotor P_{mrgA} é inibido na presença de metais divalentes, foram ainda realizados dois experimentos adicionais. Cultivou-se a mesma linhagem em meio mínimo para *B.subtilis* em meio LB na presença de um quelante de metais (0,1M de EGTA). No entanto, em nenhum dos dois casos foi possível detectar a produção do gene alvo. De fato, o resultado negativo pode ser parcialmente explicado, pois a região operadora do promotor não foi alterada durante a construção do promotor descrito por Ribeiro-dos-Santos e colaboradores (2010). Dessa forma, é bastante plausível que a proteína PerR ainda consiga ligar-se a região operadora e inibir a ação desse promotor na presença de quantidades traço de metais divalentes.

Figura 21- Sistema de expressão envolvendo o promotor P_{mrgA} nativo e o plasmídeo derivado do pHCMC03.

(A) Figura esquemática do plasmídeo pBB-PAMeGFP (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010). Destaques para o promotor P_{mrgA} em azul e para o gene da proteína verde fluorescente (eGFP) destacado em verde. (B) Figura esquemática do plasmídeo pHCMRGA_eGFP construído a partir da clonagem do cassete de expressão do pBB-pan-eGFP no arcabouço do pHCMC03. (C) Ensaio qualitativo de produção de GFP em placa de petri. Após o crescimento por uma noite em placa as cepas de *E.coli* albergando o plasmídeo pHCMCMRGA_GFP foram expostas luz ultravioleta (254 nm) e imagens foram captadas por câmera fotográfica de alta definição. **Amostras:** 1- *E.coli* DH5- α (controle negativo), 2 a 6- diferentes clones de *E.coli* obtidos portadores do plasmídeo pHCMRGA_eGFP e 7) *E.coli* DH5- α transformada com o plasmídeo pBB-PAMeGFP (controle positivo). C-: Controle negativo. C+: Controle positivo.

Com o objetivo de contornar a ação reguladora da proteína PerR sobre o promotor P_{mrgA} , por conseguinte, torná-lo constitutivo e potencialmente forte, propomos algumas modificações na região operadora. De fato, Chen e colaboradores (1995) descreveram algumas modificações capazes de tornar esse promotor irresponsivo à concentração de metais e/ou estresse oxidativo. A figura 22A ilustra a posição e a natureza das modificações genéticas encontradas em cada um dos quatro variantes que demonstraram atividade constitutiva do promotor P_{mrgA} . Tratam-se de uma deleção de parte da região operadora na

posição 1266, duas inserções de timina nas posições 1253 e 1273 e, finalmente uma transversão G-T na posição 1267. Diante do exposto acima, propõe-se a remoção da região operadora (*PER box*), conservando a integridade das regiões -35 e -10, bem como da região espaçadora como demonstra a parte inferior da figura 22A.

A remoção da região operadora foi realizada por meio da técnica de SOE descrita nos materiais e métodos. Inicialmente, foram obtidos os dois fragmentos gênicos, o primeiro correspondente à região à montante do operador 569 pb (Figura 22B) e o segundo composto pela sequência à jusante do mesmo e pelo gene da eGFP 813 pb (Figura 22B). Concluída as duas primeiras amplificações, as reações de SOE foram realizadas utilizando como DNA molde uma mistura equimolar dos fragmentos obtidos na etapa anterior. Como pode ser observado na figura 3C, uma banda correspondente ao fragmento esperado de 1.382 pb (Frag1+Frag2) foi obtida após todas as amplificações realizadas em um gradiente de temperatura que variou de 53 °C a 60 °C. No momento, experimentos de clonagem estão sendo conduzidos no sentido de inserir o promotor gerado nas duas séries de vetores propostas por esse trabalho.

Figura 22- Esquema ilustrativo da construção da versão modificada do promotor P_{mrgA} .

(A) Modificações propostas na sequência original do promotor. A parte superior contempla a sequência nativa com as modificações descritas que levam à atividade constitutiva desse promotor, enquanto a parte inferior demonstra deleção realizada por esse estudo. (B) Obtenção dos fragmentos para construção do promotor mutado pela técnica de *Splicing Overlap Extension* (SOE). **Amostras:** 1- Marcador GeneRuler™ 1kb (#1163 Fermentas); 2- Fragmento 1 e 3- Fragmento 2. (C) Obtenção do P_{mrgA} modificado a partir dos dois fragmentos gerados. **Amostras:** 1- Marcador GeneRuler™ 1kb (#1163 Fermentas), 2 a 6- reações de SOE em gradiente de temperatura de anelamento respectivamente 53°C, 54°C, 55°C, 57°C e 60°C.

4.2 Avaliação do potencial de *L.innocua* como veículo de entrega para antígenos heterólogos

O nosso laboratório vem se dedicando ao emprego de veículos vacinais vivos para entrega de antígenos heterólogos por mais de vinte anos. Dentre esses trabalhos destacam-se a utilização dos microrganismos *Salmonella Typhimurium* e *B.subtilis*. Como já foi comentado, durante o trabalho de mestrado utilizamos *B.subtilis* como veículo de entrega para antígenos dos vírus HPV e HSV. O período de estágio na Harvard Medical School nos permitiu avaliar outro sistema procarioto quanto à capacidade de promover a entrega de antígenos heterólogos a células do sistema imunológico, a *L.innocua*.

A ovalbumina (OVA) foi inicialmente utilizada como antígeno modelo para avaliar desempenho de *L.innocua* como veículo para entrega de antígenos heterólogos. A escolha desse antígeno não foi fortuita, mas sim norteadada pela disponibilidade de um modelo de apresentação de antígenos *ex-vivo* específico para o epítipo reconhecido por células TCD8⁺ desse antígeno modelo, denominado de ensaios com células B3Z. Para que expressão desse antígeno fosse possível, linhagens de *L.innocua* foram transformadas com os plasmídeos pAM401_OVA e pAM401_AK2T_cytoLLO_OVA, dando origem respectivamente às linhagens LI_OVA e LI_LLO_OVA (Figura 23 e Quadro 2). A primeira linhagem codifica apenas para OVA enquanto que a última possui duas unidades de expressão, uma que codifica para OVA e outra codifica para proteína Listeriolisina O (LLO) de *L.monocytogenes*. O primeiro plasmídeo é um controle negativo, pois a co-expressão de LLO faz-se necessária para o funcionamento do ensaio com as células B3Z. Isso ocorre porque esse ensaio é específico para o epítipo TCD8 da OVA, o qual deve ser apresentado na superfície de células fagocíticas por moléculas de MHC de classe I (MHC-I), conjunto de eventos que ocorre prioritariamente com antígenos processados no citoplasma. A LLO codificada pelo plasmídeo pAM401_AK2T_cytoLLO_OVA tem o papel de promover o escape do fagolisossomo e possibilitar que a ovalbumina produzida seja processada no citoplasma e, finalmente, que seu epítipo reconhecido por células TCD8⁺ seja disposto na superfície da célula fagocítica via MHC-I para a posterior ativação das células B3Z.

Figura 23-Desenho esquemático dos plasmídeos utilizados para expressão do antígeno modelo ovalbumina em *B.subtilis* e *L.innocua*.

Destaques para os promotores *P_{hyper}*, em azul, para as marcas de seleção *Cm G(+)* e *Cm G(-)*, em vermelho, que indicam resistência ao cloranfenicol em bactérias gram-positivas e em gram-negativas, respectivamente e para região *RepE* também em vermelho responsável pela replicação do plasmídeo em *B.subtilis* e *L. innocua*. (A) pAM401_OVA: Promove a expressão de ovalbumina sob o controle do promotor *P_{hyper}*. (B) pAM401_Ak2t_cytoLLO_OVA: Promove a co-expressão de ovalbumina, destacada em verde, e listeriolisina O (LLO), em amarelo, sob o controle de dois promotores *P_{hyper}* distintos separados por um terminador (*Ter*), em azul.

Uma vez que o potencial de *B.subtilis* como veículo vacinal já fora estabelecido e a utilização de linhagens de *L.innocua* para esse fim não foi explorada, decidiu-se utilizar linhagens de *B.subtilis* transformadas com os mesmos plasmídeos como controle positivo dos ensaios. A linhagem de *B.subtilis* albergando o plasmídeo pAM401_OVA foi denominada de BS_OVA, ao passo que a cepa de *B.subtilis* transformada com o plasmídeo pAM401_Ak2t_cytoLLO_OVA foi denominada de BS_LLO_OVA. Após as transformações, todas as linhagens construídas foram crescidas e submetidas à análise de expressão *in vitro* por meio de ensaios de *western blot* com anticorpos policlonais contra LLO ou contra OVA, conforme descrito nos materiais e métodos.

Como esperado, foi possível detectar a produção de ovalbumina pela linhagem LI_OVA (Figura 24A), assim como a produção de OVA e de listeriolisina (LLO) pela cepa LI_LLO_OVA (Figura 12). No caso de *B.subtilis*, não se detectou a expressão OVA nas linhagens BS_OVA e BS_LLO_OVA (Figura 24B). No entanto, a produção de LLO foi observada por parte dessa última linhagem (Figura 24A). Ao todo, foram testadas cinquenta colônias

obtidas após diferentes transformações de linhagem de *B.subtilis* com os dois plasmídeos citados, mas novamente não se obteve a expressão de ovalbumina e a expressão de listeriolisina foi obtida em todas as cepas transformadas com o plasmídeo pAM401_Ak2t_cytoLLO_OVA (dados não mostrados). Não conseguimos estabelecer as razões para esse resultado, uma vez que o promotor que dirige a expressão de LLO é idêntico ao de OVA.

Figura 24- Análise de expressão in vitro de linhagens de *B.subtilis* e *L.innocua* albergando os plasmídeos pAM401_OVA ou pAM401_AK2t_cytoLLO_OVA.

(A) Ensaio de imunodeteção utilizando anticorpos policlonais contra ovalbumina (OVA). (B) Ensaio de imunodeteção utilizando anticorpos policlonais contra a proteína Listeriolisina (LLO). **Amostras:** 1- *L.innocua*, 2- LI_OVA, 3- LI_LLO_OVA, 4- Ovalbumina (OVA) (A) ou Listeriolisina (B) 5- *B.subtilis*, 6- BS_OVA, 7-BS_LLO_OVAe 8- Ovalbumina (A) ou Listeriolisina (B).

A falha na expressão de ovalbumina por linhagens recombinantes de *B.subtilis* nos impediu de realizar a análise comparativa proposta entre as duas bactérias gram-positivas e não patogênicas quanto ao desempenho na veiculação do antígeno em ensaio *ex-vivo*. O ensaio com as células B3Z foi realizado apenas com as linhagens de *L.innocua* e utilizou-se como controle positivo uma linhagem atenuada de *L.monocytogenes* denominada de Lmdd (THOMPSON et al., 1998). A Lmdd conserva todos os fatores de virulência da espécie e sua atenuação foi realizada a partir de uma dupla deleção nos genes *dal* e *dat* relacionados ao metabolismo de alanina. A linhagem Lmdd foi transformada com o plasmídeo pAM401_OVA, dando origem a estirpe Lmdd_OVA, a qual teve a expressão de ovalbumina atestada por ensaios de *western blot* (dados não mostrados). Como foi descrito no item materiais e métodos, quantidades que variaram entre 10^3 UFC e 10^8 UFC das linhagens bacterianas utilizadas foram submetidas ao contato com 10^5 células apresentadoras de antígenos (células RAW 309 Cr.1). A eficiência na apresentação do antígeno foi monitorada por ensaio colorimétrico a partir da ativação das células B3Z.

A linhagem Lmdd_OVA atingiu seu desempenho máximo com o título de 10^5 UFC, atingindo absorvância de $0,51 (\pm 0,27)$ no ensaio colorimétrico, ao passo que o peptídeo TCD8 específico para ovalbumina (SIINFEKL) atingiu $0,767 (\pm 0,18)$ (Figura 25). A linhagem experimental LI_LLO_OVA foi capaz de veicular o antígeno OVA alcançando o máximo de eficiência na concentração de 10^7 UFC ($0,393 \pm 0,07$). Como esperado a linhagem utilizada como controle negativo, LI_OVA, que produz apenas ovalbumina, não foi capaz de desencadear a apresentação desse antígeno no ensaio. O desempenho da linhagem da linhagem LI_LLO_OVA foi cerca de 100 vezes inferior ao obtido com a estirpe recombinante de *L.monocytogenes*(Lmdd_OVA). Esse resultado já era esperado uma vez que tal cepa atenuada ainda conta com outros fatores de virulência que auxiliam no escape do fagolisossomo e culminam com a melhor apresentação do antígeno.

Figura 25- Análise da capacidade de veiculação de antígenos pelas linhagens de *L.innocua* em ensaio com células B3Z.

O eixo das abscissas representa a eficiência de apresentação do antígeno alvo (ovalbumina) expressos em unidades de absorbância, enquanto que o eixo das ordenadas contempla o número de bactérias empregado em cada ensaio. Lmdd_OVA: Linhagem atenuada de *L.monocytogenes* albergando o plasmídeo pAM401_OVA. LI_LLO_OVA: Linhagem de *L.innocua* albergando o plasmídeo pAM401_Ak2t_cytoLLO_OVA. SIINKFEL: Peptídeo sintético de ovalbumina restrito ao MHC-I (controle positivo). LI_OVA: Linhagem de *L.innocua* albergando o plasmídeo pAM401_OVA.

Confirmada a eficiência de *L.innocua* como veículo de entrega de proteínas heterólogas em ensaios *ex-vivo*, decidiu-se explorar a capacidade desse microrganismo utilizando um antígeno vacinal real. O antígeno escolhido foi uma porção da proteína P1 de *S.mutans* denominada de SBR (*Saliva Bindind Region*). Essa região vem sendo utilizada com sucesso pelo nosso grupo em estratégias vacinais empregando linhagens recombinantes de *B.subtilis* capazes de produzir o referido antígeno (TAVARES et al., 2010).

Para que a produção de SBR fosse possível a partir de linhagens recombinantes de *L.innocua*, construímos mais um plasmídeo, o pAM401_SBR (Figura 26A). Esse plasmídeo foi construído após a substituição do gene que codifica para ovalbumina do plasmídeo pAM401_OVA pela sequência gênica que codifica para a proteína SBR. Esse último, por sua vez, foi obtido por PCR a partir dos iniciadores específicos conforme descrito nos materiais e métodos. Após a confirmação dessa clonagem, a linhagem CLIP11262 de *L.innocua* foi transformada com plasmídeo pAM401_SBR, dando origem a estirpe LI_SBR. A Linhagem 1012 de *B.subtilis* também foi transformada com o mesmo plasmídeo para ser utilizada como controle positivo, dando origem cepa BS_SBR. A confirmação da expressão *in vitro* das

duas linhagens geradas foi conduzida por ensaios de *western blot* com anticorpos específicos contra a proteína SBR. Como pode ser observado na figura 26 B e C, a expressão da proteína SBR foi detectada tanto em linhagens de *B.subtilis*, quanto em *L.innocua*, atestando a funcionalidade do sistema nos dois hospedeiros.

Figura 26- Construção de linhagens de *B.subtilis* e *L.innocua* capazes de produzir a proteína SBR.

(A) Desenho esquemático do plasmídeo pAM401_SBR construído para produção de SBR nos dois hospedeiros, *B.subtilis* e *L.innocua*. Destaques para o promotor *P_{hyper}* em azul, para as marcas de seleção Cm G(+) e Cm G(-), em vermelho, que indicam resistência ao cloranfenicol em bactérias gram-positivas e em gram-negativas, respectivamente e para região RepR, também em vermelho, responsável pela replicação nos dois hospedeiros gram-positivos. (B) Análise de expressão *in vitro* em *L.innocua* albergando o plasmídeo pAM401_SBR. (C) Análise de expressão *in vitro* em *B.subtilis* albergando o plasmídeo pAM401_SBR. **Amostras:** 1- Proteína SBR purificada, 2- *L.innocua* CLIP11262e 3 a 6- diferentes clones obtidos após a transformação de *L.innocua* com o plasmídeo pAM401_SBR. (B) Análise de expressão *in vitro* em *B.subtilis* albergando o plasmídeo pAM401_SBR. **Amostras:** 1- *B.subtilis* 1012, 2 a 4- Diferentes clones obtidos após a transformação de *B.subtilis* com o plasmídeo pAM401_SBR e 5- Proteína SBR purificada. Ensaio realizado com anticorpos policlonais anti-SBR obtidos a partir de camundongos imunizados com a proteína SBR purificada.

Com a expressão *in vitro* confirmada, foram realizados ensaios de imunização pela via subcutânea com as linhagens recombinantes de *B.subtilis* e *L.innocua* capazes de produzir SBR. Grupos de cinco camundongos Balb/c foram imunizados com três doses intercaladas por de sete dias contendo 10^8 UFC de *B.subtilis* ou *L. innocua*. Amostras de soro foram colhidas antes de cada dose e sete dias após a última dose. A partir de um *pool* dos soros obtidos de cada grupo, foram determinados os títulos de anticorpos específicos para a proteína SBR. Somente após a terceira dose foi possível detectar a presença de anticorpos específicos nos grupos imunizados com as linhagens LI_SBR e BS_SBR. O grupo imunizado com esse último apresentou título médio de 750 ($\pm 148,8$) enquanto que o grupo imunizado com a *L.innocua* recombinante atingiu o título médio 3.746 ($\pm 437,7$) (Figura 27A).

Após o final das imunizações, os animais foram sacrificados e seus baços colhidos para a análise de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ específicos para o antígeno alvo. Nos animais imunizados com a linhagem BS_SBR observou-se a detecção média de 1,84% ($\pm 0,12$) de linfócitos TCD4⁺ e 0,31% ($\pm 0,07$) de Linfócitos TCD8⁺ específicos para proteína SBR. Já nos animais que receberam a linhagem LI_SBR, detectou-se a presença de 1,82% ($\pm 0,1$) de linfócitos TCD4⁺ e 0,65% ($\pm 0,05$) de linfócitos TCD8⁺ específicos para o antígeno alvo. Diante do exposto acima, observa-se que linhagens recombinantes de *L.innocua* foram tão eficientes quanto àquelas de *B.subtilis* na indução de resposta imunológica, tanto no tocante a produção de anticorpos específicos quanto na ativação de resposta celular. Esse conjunto de dados mostra que linhagens de *L.innocua* possuem potencial promissor na utilização como veículos vacinais vivos.

Figura 27- Avaliação da resposta imunológica específica induzida após as imunizações com linhagens recombinantes de *L.innocua* e *B.subtilis* capazes de produzir a proteína SBR.

(A) Detecção de anticorpos IgG circulantes específicos para proteína SBR por ensaios de ELISA. Os títulos observados após a primeira e a segunda doses ficaram abaixo dos níveis detectáveis pelo ensaio e não se encontram representados no gráfico. Os ensaios de ELISA foram conduzidos a partir de *pool* de soros dos camundongos de cada grupo. (B) Detecção de linfócitos T CD4⁺ INF- γ ⁺ específicos para proteína SBR. (C) Detecção de linfócitos T CD8⁺ INF- γ ⁺ específicos para proteína SBR. **Grupos de imunização:** *B.subtilis*: grupo imunizado com *B.subtilis* 1012, *L.innocua*: grupo imunizado com *L.innocua*CLIP 11262, BS_SBR: linhagem de *B.subtilis* albergando o plasmídeo pAM401_SBR e LI_SBR: *L.innocua* albergando o plasmídeo pAM401_SBR. A análise dos linfócitos específicos foi realizada a partir de *pool* de macerado de baços de camundongos imunizados marcados com anticorpos específicos conjugados a fluoróforos e detectados por citometria de fluxo no equipamento FACSCalibur. Os gráficos foram confeccionados utilizando os programas computacionais FlowJo 10.0 e GraphPad Prism 5.0.

5DISCUSSÃO FINAL

O principal entrave na aplicação de *B.subtilis* como plataforma de expressão heteróloga reside na baixa disponibilidade de sistemas de expressão heteróloga (TERPE, 2006; WESTERS; WESTERS; QUAX, 2004). Plasmídeos estáveis e que permitem alto número de cópias, além de promotores fortes e transcritos estáveis estão entre as principais características de um sistema de expressão eficiente (BILLMAN-JACOB, 1996; PHAN; NGUYEN; SCHUMANN, 2012). No presente trabalho, procuramos desenvolver sistemas de expressão heteróloga eficientes para *B.subtilis*. Para que esse objetivo fosse atingido testamos diferentes arcabouços plasmidiais e promotores nativos e modificados. Após o final dos experimentos propostos, apresentamos dois novos sistemas de expressão heteróloga para esse hospedeiro. Ambos os plasmídeos são derivados do pMTL500E e, portanto, encerram alto número de cópias por célula e demonstram alta estabilidade segregacional e estrutural (BRUAND et al., 1993; BRUAND; EHRLICH, 1988; CLEWELL et al., 1974; OULTRAM et al., 1988). No primeiro sistema, denominado de pFGgsiB, a expressão do gene alvo fica a cargo do promotor derivado do gene *gsiB* (*glucose starvation inducible*) (P_{gsiB}). O outro plasmídeo, denominado de pFG43, alberga uma versão modificada do promotor do gene da citidina desaminase, mais conhecido como P_{43} . A condição cultivo para expressão máxima para cada sistema foi determinada a partir da detecção da proteína repórter GFP. A expressão do referido repórter também foi utilizada para estudos comparativos entre o desempenho dos plasmídeos propostos e dois vetores já descritos pela literatura, o pHCM02 (NUYGEN et al., 2005) e o disponível comercialmente pHT01 (MoBiTec). Por meio de diferentes técnicas de detecção, demonstrou-se que os dois sistemas desenvolvidos por esse trabalho apresentam desempenho superior aos plasmídeos pHT01 e pHCM02.

A ativação eficiente do promotor P_{gsiB} necessita de estímulos de estresse, tais como a adição de etanol, NaCl ou o aumento da temperatura (LUIZ et al., 2008; MAUL et al., 1994; NGUYEN et al., 2005; PACCEZ et al., 2006). O emprego dessas condições no contexto de sistemas de expressão heteróloga pode dificultar a expressão ou contribuir para o dobramento incorreto das proteínas heterólogas produzidas. O estresse em *B. subtilis* leva à transcrição vários genes, somente o σ^B , principal fator sigma relacionado ao estresse, dirige a expressão de mais de 200 genes (BRIGULLA et al. 2003; KOVÁCS et al., 1998; NANNAPANENI, et al., 2012; PETERSOHN et al., 2001; PRICE et al., 2001; VÖLKER et al. 1994). O direcionamento dos aparatos de transcrição e tradução para esse fim podem concorrer com o sistema de expressão heteróloga e culminar com diminuição da produção do produto recombinante. O aumento da temperatura durante o processo de produção heteróloga pode tanto dificultar o dobramento correto da proteína, bem como promover sua desnaturação após sua síntese completa. No caso da versão de GFP utilizada, nesse trabalho, a temperatura empregada para ativar o promotor P_{gsiB} (45 °C) pode dificultar apenas o folding correto. A proteína em sua conformação correta é estável a essa temperatura, ao passo que sua síntese em temperaturas acima dos 37 °C não havia sido testada (SCHOLZ et al., 2000; TSIEN, 1998).

No contexto do plasmídeo pFGgsiB, observou-se a franca atividade do promotor P_{gsiB} sem a necessidade da aplicação de estímulos de estresse. A única condição onde a produção do repórter superou o cultivo em condições ordinárias para esse sistema foi a presença de altas concentrações de cloreto de sódio (6% e 8%). No entanto, essas condições são drásticas para *B. subtilis* e dificultam bastante a duplicação bacteriana, podendo ainda levar as bactérias à morte (VÖLKER et al., 1992). Diante da toxicidade dessas condições para *B. subtilis*, bem como dos efeitos deletérios do crescimento sob estresse para produção heteróloga, a melhor condição de crescimento para o sistema baseado no plasmídeo pFGgsiB é o cultivo a 37 °C sob agitação. Acreditamos que o elevado número de cópias de nosso sistema tenha contribuído para subversão do controle do promotor P_{gsiB} . A marcante superioridade do plasmídeo pFGgsiB_GFP sobre o pHCMC03_GFP fortalece nossa hipótese, uma vez que a principal diferença entre esses dois sistemas testados reside no número de cópias. Em suma, conseguimos utilizar o potencial do promotor P_{gsiB} em um sistema de expressão heteróloga eficiente sem a necessidade da adição de indutores ou exposição a condições de estresse.

A sequência nativa do promotor P_{43} foi empregada em diferentes sistemas de expressão heteróloga (GAT et al., 2003; LU et al., 2010; WESTERS et al., 2006; WU; WONG, 1999; ZHANG et al., 2012). Em todos esses trabalhos, a atividade desse promotor foi avaliada apenas em condições ordinárias, a despeito da existência de regiões compatíveis com o fator sigma de estresse global (σ^B) na sequência promotora (SONG; NEUHARD, 1989; WANG; DOI, 1984). No presente trabalho, demonstramos que o cultivo em condições de estresse mediados pela adição de etanol ou de NaCl ou ainda pelo aumento de temperatura levaram a redução significativa da atividade do promotor. Mais interessante ainda, foi o fato de que esse fenômeno foi observado de forma gradativa, isto é, quanto mais extrema foi a condição menor foi a atividade do promotor. Esses dados apontam para uma regulação negativa desse promotor nas condições de estresse testadas, provavelmente devido à influência do sigma B produzido nessas condições sobre o promotor. Dessa forma, ficou estabelecido que a condição para máxima produção desse sistema foi o simples crescimento em condições fisiológicas como já havia sido mostrado em outros trabalhos envolvendo essa sequência promotora.

No presente trabalho, propôs-se uma alteração no promotor P_{43} que consistiu na adição do RBS do promotor P_{gsiB} à jusante da sequência nativa. Essa modificação teve o objetivo de valer-se da estabilidade do RNAm do gene *gsiB*, a qual é conferida pela presença de um RBS forte, para uma maior eficiência de tradução (JÜRGEN; SCHWEDER; HECKEL, 1998). Essa estratégia foi empregada na construção do promotor P_{grac} presente no plasmídeo comercial pHT01, bem como em outros trabalhos envolvendo os promotores da manose, P_{man} e P_{spac} (LEE et al. 2010a; 2010b; PHAN et al., 2010; WENZEL et al., 2011). Como só utilizamos a versão modificada do P_{43} , não podemos precisar se tal alteração de sequência levou a algum ganho de expressão. No entanto, trata-se da primeira vez que se mostra a funcionalidade de uma versão modificada do bem estabelecido P_{43} .

O cultivo prolongado das linhagens produtoras de GFP construídas nesse trabalho permitiu observar o desempenho superior dos plasmídeos pFG*gsiB* e pFG43, frente aos plasmídeos pHT01 (MoBiTec) e pHCMC02 (NUYGEN et al., 2005). De modo geral, a incubação prolongada levou a maior detecção do repórter utilizado em todos os sistemas testados. Porém, nos dois sistemas desenvolvidos durante esse trabalho esse incremento foi bem mais evidente e, a detecção do repórter, após uma noite de cultivo, superou, em pelo menos três vezes, os valores atingidos após quatro horas de cultivo. Apesar do trabalho original que

descreve o plasmídeo comercial pHT01 (NUYGEN et al., 2007) não ter avaliado o desempenho desse sistema em incubação prolongada, trabalhos posteriores indicaram que os melhores níveis de expressão com esse sistema são alcançados após doze horas de cultivo (ILK et al., 2011; YING et al., 2012). Quanto ao sistema baseado no plasmídeo pHCMC02, o seu desempenho só havia sido acompanhado por períodos inferiores a quatro horas (NUYGEN et al., 2005; PACCEZ et al., 2007).

O aumento da atividade do promotor P_{43} após longos períodos de incubação já havia sido mostrado no trabalho que o descreveu, bem como quando foi usado em plasmídeos para expressão heteróloga (WANG; DOI, 1984; YE et al., 1999; YING et al., 2012; ZHANG et al., 2012). Embora ainda não tenha sido explorado por outros trabalhos, acreditamos que esse aumento substancial na atividade desse promotor na fase estacionária seja devido à atividade do fator sigma B. Os estímulos de estresse na fase exponencial como adição de sal e etanol ou o aumento da temperatura levaram a redução da atividade desse promotor, ao passo que o estresse mediado pela carência de nutrientes, comuns em cultivos prolongados, levaram ao aumento da atividade do promotor. Provavelmente, o balanço entre os fatores sigma A e B na fase estacionária desempenha papel importante na melhoria do desempenho do promotor P_{43} . Quanto ao promotor P_{gsiB} , a carência de nutrientes já foi descrita como um estímulo capaz de promover sua atividade (EYMANN; HECKER, 2001; MAUL et al., 1995). A aparente contradição de apenas esse tipo de estresse ter estimulado o promotor pode, pelo menos parcialmente, ser explicada pela resposta diversa em *B. subtilis* aos diferentes tipos de estresse (IGOSHIN et al., 2007; VÖLKER et al., 1994;)

As análises de citometria de fluxo confirmaram os dados obtidos por luminometria, estabelecendo mais uma vez que os dois plasmídeos propostos pelo presente trabalho demonstraram desempenho superior aos observados para o plasmídeo comercial pHT01. Outra observação interessante foi a de que a superioridade dos plasmídeos pFGgsiB e pFG43 justificava-se pela homogeneidade de expressão gênica e não pela presença de células capazes de produzir mais GFP. No caso do sistema baseado do pHT01, observou-se níveis de expressão heterogêneos após a análise individual das células submetidas ao cultivo por uma noite. Esse fenômeno parece não ser exclusivo do promotor do sistema comercial P_{grac} , uma vez que também foi observado ao testarmos o plasmídeo pHCMC03 o qual alberga o promotor P_{gsiB} no mesmo cerne do plasmídeo comercial (pMTLBS72).

O comportamento diverso entre células clonais submetidas as mesmas condições de cultivo é conhecido como biestabilidade e tem sido observado em diferentes procariotos, tais como *E.coli*, *Staphylococcus aureus* e *B.subtilis* (BALABAN et al., 2004; BIGGER, 1944; STOJANOV; SAKWINSKA; MOREILLON, 2013). Em *B.subtilis* esse fenômeno foi observado durante a esporulação, desenvolvimento de competência, motilidade e “chaining” (DUBNAU; LOSICK, 2006; GRAUMANN, 2006; VEENING; SMITS; KUIPERS, 2008). O termo biestabilidade foi inicialmente cunhado para descrever fenômenos dicotômicos, daí o prefixo “bi”. Por exemplo, em um cultura de *B.subtilis* em fase estacionária geneticamente idêntica, aproximadamente 10% das células tornam-se competentes e caso uma dessas células for cultivada novamente dará origem a uma população isogênica com a mesma percentagem de bactérias competentes (DUBNAU; LOSICK, 2006). Como foi citado acima, os sistemas baseados no arcabouço do plasmídeo comercial e nos promotores P_{gsiB} e P_{grac} exibiram características semelhantes à biestabilidade. Embora a expressão gênica desencadeada por esses plasmídeos não seja um evento complexo e dicotômico, como esporulação ou desenvolvimento de competência, esses dois promotores integram importantes *regulons* em *B.subtilis*. O promotor do gene *gsiB* está ligado à resposta global de estresse, ao passo que o promotor de GroEl/GroES compõe o grupo das chaperonas e está relacionado principalmente ao dobramento correto e degradação de proteínas não funcionais durante o aumento repentino de temperatura ou adição de etanol (MAUL et al., 1995; SCHMIDT et al., 1992; SCHWEDER et al., 1999; SEYDLOVÁ et al., 2012; VÖLKER et al., 1994). Dessa forma, a pouca uniformidade de expressão em células transformadas por esse plasmídeo pode ter sido influenciada pelo fenômeno da biestabilidade. Vale destacar, mais uma vez, que o sistema baseado no plasmídeo pFGgsiB, que também alberga o P_{gsiB} , não apresentou esse entrave. Provavelmente o alto número de cópias dos derivados do plasmídeo pFG20 subverteu esse fenômeno. A uniformidade de expressão também é uma característica importante em sistemas de expressão heteróloga, uma vez que viabiliza e facilita o escalonamento da produção heteróloga.

Os ensaios de estabilidade segregacional acompanham a propagação dos plasmídeos ao longo das gerações na ausência de pressão seletiva, ao passo que a estabilidade estrutural remete-se à manutenção integridade da informação genética codificada pelos plasmídeos. Esses últimos são realizados na presença da marca de seleção e a estabilidade é calculada a partir da percentagem de colônias que mantém a produção do

gene alvo. De modo geral, nos trabalhos que avaliam a estabilidade plasmidial esses ensaios são realizados em experimentos separados e a análise de estabilidade estrutural é determinada apenas qualitativamente, isto é, a manutenção dos níveis de expressão não é avaliada. (BROCKMEIER; WENDORFF; EGGERT, 2006; NUYGEN et al., 2005; XIA et al., 2007). No presente trabalho, utilizou-se um ensaio que fornece indícios dos dois tipos de estabilidade: o cultivo na ausência da pressão seletiva e a estabilidade mensurada pela detecção do produto do gene alvo. A utilização da citometria de fluxo como método de detecção da produção de GFP nos permitiu observar, que não só os plasmídeos, mas também os níveis de expressão mantiveram-se constantes entre as células em cultivo apesar da presença do antibiótico de seleção. O ensaio realizado simula melhor as condições em que os sistemas de expressão são submetidos durante o crescimento em larga escala. Nesse tipo de cultivo são comuns a incubação por longos períodos e a alta densidade celular, situações onde a degradação dos antibióticos responsáveis pela manutenção dos plasmídeos é iminente. Além disso, em processos industriais a adição de antibióticos não é uma opção viável principalmente devido ao próprio custo da droga, bem como pelas dispendiosas técnicas necessárias à sua remoção após o final do processo (KROLL et al., 2010).

A visualização das linhagens de *B. subtilis* albergando os plasmídeos construídos em microscopia ótica com suporte à fluorescência, bem como a disposição dos extratos proteicos totais em SDS-PAGE, mostrou que a linhagem albergando o plasmídeo pFG43_GFP apresentou o maior desempenho de todos os sistemas testados. Esses últimos achados vão de encontro aos dados obtidos por luminometria e citometria de fluxo, os quais apontaram equivalência entre os sistemas desenvolvidos por esse trabalho. Acreditamos que ambas as metodologias empregadas a priori estavam no seu limite superior de detecção e, por esse motivo, não foram capazes de discernir a diferença entre o desempenho dos dois plasmídeos. De fato, outros pesquisadores observaram esse fenômeno ao testar a atividade de promotores fortes, tais como o promotor do gene da HSP60 de *E. coli* (EFTINK, 1997; SCHOLZ et al., 2000). Nesses trabalhos, a ausência de linearidade na detecção de altas concentrações de GFP é atribuída ao efeito de filtro interno, evento comum em ensaios envolvendo detecção de fluorescência (LAKOWICZ, 1983). Uma outra hipótese é que uma fração da GFP produzida pelo sistema pFG43 encontre-se dobrada de maneira incorreta e, portanto, não funcional. No entanto, essa última hipótese é enfraquecida pelo fato de que as células albergando esse sistema emitiram uma quantidade muito superior de luz durante a

execução da microscopia quando comparadas a células dos outros sistemas avaliados. Além disso, como foi mencionado na introdução, apenas quatro trabalhos relataram a obtenção de proteínas insolúveis em *B.subtilis*. Em suma, constatamos que o sistema de expressão baseado no plasmídeo pFG43 foi o mais eficiente dos sistemas desenvolvidos no que concerne a produção heteróloga.

Na segunda parte desse trabalho, propomos a utilização de *L.innocua* como veículo vivo para a entrega de antígenos vacinais. Como o próprio nome do procarioto sugere, essa bactéria raramente causa doença para homens e animais. Há apenas dois relatos de infecções causadas por *L.innocua*. O primeiro trata-se de uma bacteremia em uma idosa de 62 anos, ao passo que o outro caso foi bovino acometido por listeriose cerebral (PERRIN; BEMER; DELAMARE, 2003; ROCHA et al., 2013). Os raríssimos casos de infecção, bem como a inocuidade desse microrganismo observada nesse trabalho apontam para segurança na utilização dessa bactéria como veículo vacinal vivo. Como foi disposto no início do trabalho, aplicamos dois conjuntos distintos de ensaios para avaliar o potencial desse microrganismo como veículo vacinal. Inicialmente demonstramos sua capacidade de veicular a ovalbumina em ensaio *ex-vivo* com as células B3Z. Em seguida, observou-se que a imunização de camundongos com a linhagem recombinante de *L.innocua* capaz de produzir a proteína SBR foi capaz de desencadear a produção específica de anticorpos, bem como a ativação do braço celular da resposta imunológica. Diante do exposto, apresentamos os primeiros indícios de que a bactéria *L.innocua* é capaz de funcionar como veículo vacinal para antígenos heterólogos.

A ideia inicial do ensaio *ex-vivo* era comparar o desempenho do proposto veículo vacinal *L.innocua* com o já estabelecido *B.subtilis*, no que concerne a capacidade de veiculação de ovalbumina (OVA) para o processamento via MHC-I. No entanto, não se observou a expressão de OVA nas linhagens de *B.subtilis* transformadas com os plasmídeos pAM401_OVA ou pAM401_AK2t_cytoLLO_OVA. Não foi possível determinar se a falha na detecção dessa proteína foi devido a problemas de expressão ou a atividade de proteases intracelulares de *B.subtilis*. No único trabalho que relata a produção dessa proteína em *B.subtilis*, o gene da OVA está integrado ao cromossomo fusionado à jusante do gene da proteína de capa do esporo CotB (CIABATTIN et al., 2004). Neste caso, a proteína só é produzida durante a esporulação e é disposta na superfície do esporo. A fusão a uma proteína largamente produzida em *B.subtilis* (CotB) e a expressão tardia de OVA podem ter

contribuído para maior síntese da proteína, redução dos possíveis efeitos tóxicos à célula ou ainda, reduzido a susceptibilidade à degradação por proteases endógenas.

Devido a falha na expressão de OVA por linhagens de *B.subtilisa* linhagem atenuada de *L.monocytogenes* Lmdd albergando o plasmídeo pAM401_OVA foi usada como controle nos ensaios com as células B3Z. A linhagem recombinante de *L.innocua* atingiu seu melhor desempenho na relação 1000:1 (Bactérias/Macrófagos), relação que foi inferior a linhagem Lmdd. Como já foi levantado, o melhor desempenho da linhagem Lmdd nesse ensaio justifica-se pela preservação outros fatores de virulência, tais como metaloproteases e fosfolipases que atuam em conjunto para a maior eficiência no escape do fagolisossomo. Entretanto, o desempenho de *L.innocua* no presente trabalho foi equivalente aos achados obtidos no estudo pioneiro que empregou *E.coli* como veículo de entrega (HIGGINS; SHASTRI; PORTNOY, 1999). Nesse trabalho, linhagens de *E.coli* recombinantes capazes de produzir LLO e OVA foram construídas e a capacidade de entrega de OVA, diretamente no citoplasma de células apresentadoras de antígenos, foi conduzido pelo mesmo ensaio com células B3Z aplicado nesse trabalho de tese. Apesar do desempenho inferior à *L.monocytogenes*, a linhagem de *L.innocua* testada mostrou-se funcional na entrega do antígeno, mostrando atividade equivalente ao estudo pioneiro realizado com *E.coli*. Além disso, possui a vantagem de não ser patogênica, reduzindo os riscos para utilização como veículo vacinal vivo.

Como já foi levantado, *B.subtilis* vem sendo empregado, inclusive pelo nosso grupo, como veículo vacinal para antígenos heterólogos (AMUGUNI; TZIPORI, 2012; CUTTING et al., 2009; FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005). Diferentes linhagens recombinantes desse microrganismo mostraram-se eficientes na indução de resposta imunológica específica após a administração pelas vias parenteral e mucosa em modelo murino. Entre esses estudos, destacam-se as estratégias envolvendo o fragmento C da toxina tetânica, a subunidade B da toxina termolábil e a porção estrutural da fímbria CFA/Iambas de *E.coli* enterotoxigênica (AMUGUNI et al., 2011; LUIZ et al., 2008; MAURIELLO et al., 2004; PACCEZ et al., 2006 e 2007;). Recente trabalho do nosso grupo demonstrou que camundongos imunizados com a porção amino terminal da proteína P1 (aminoácidos 39-512) de *S.mutans*, obtida a partir de linhagens recombinantes de *B.subtilis*, desencadeou resposta de anticorpos específica para o antígeno alvo (TAVARES et al., 2010). Esses anticorpos foram inclusive capazes de reconhecer o *S.mutans* e demonstram-se eficientes em ensaios correlatos de inibição de

colonização e agregação do patógeno. O *S.mutans* como já foi mencionado é o principal causador da cárie dental humana e a P1 a mais significativa proteína de superfície e o antígeno mais utilizado em estratégias vacinais que visam o controle da cárie. A porção desse proteína utilizada no estudo acima é mais conhecida como SBR (*Saliva Binding Region*), e como o próprio nome sugere medeia a principal etapa de adesão desse patógeno à superfície dental.

A construção de um plasmídeo capaz de promover a expressão de SBR em *B.subtilis* e *L.innocua* permitiu uma análise comparativa quanto à capacidade das bactérias em veicular o antígeno e promover resposta imunológica específica. Após três imunizações por via subcutânea com as linhagens recombinantes dos dois microrganismos, observou-se que a linhagem recombinante de *L.innocua* foi capaz de desencadear maior título de anticorpos específicos contra a proteína SBR. A análise de linfócitos T mostrou desempenho equivalente dos dois veículos na indução de linfócitos TCD4⁺ específicos, ao passo que linhagens de *L.innocua* foram capazes de ativar maior número de linfócitos T CD8⁺. Diante do exposto, observamos que, para esse antígeno específico, *L.innocua* não só funcionou como veículo vacinal, como foi também foi mais eficiente do que o largamente empregado *B.subtilis*. Outro aspecto interessante foi a destacada ativação de resposta TCD8⁺ específica foi observada após a imunização com *L.innocua*. Provavelmente, *L.innocua*, pelo menos em pequena escala, promove o escape de proteínas do fagolisossomo e a posterior apresentação de antígenos via MHC-I ou ainda, induz a apresentação cruzada de antígenos (*crosspresentation*).

A ativação de células TCD8⁺ é comum apenas após o contato com patógenos capazes de invadir e multiplicar-se no interior das células do hospedeiro, tais como *L.monocytogenese* os diferentes tipos de vírus. Além de ser importante na resposta efetiva contra patógenos intracelulares, a ativação de células TCD8⁺ também é fundamental na imunidade contra vários tipos de câncer. A maioria das estratégias vacinais resultana geração de anticorpose muitas vezes carece do braço celular da resposta imune. Dessa forma, o desenvolvimento de sistemas capazes de desencadear tanto a produção de anticorpos, como a ativação de resposta celular despertam bastante interesse em vacinologia, sobretudo no tocante a vacinas para patógenos que possuem ciclo de vida intracelular e extracelular.

6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho desenvolvemos dois sistemas de expressão heteróloga para *B.subtilis* capazes de dirigir a produção de genes repórter em níveis superiores aos alcançados pelo único sistema comercial disponível. Um dos plasmídeos construídos, o pFGSI, possibilitou ainda a expressão do gene híbrido gDE7, façanha não alcançada pelos plasmídeos disponíveis no laboratório nem pela série de vetores comerciais derivadas do pHT01.

O trabalho feito nos permitiu obter um sistema de expressão heteróloga funcional em dois hospedeiros, *B.subtilis* e *L.innocua*. Demonstramos ainda, que animais imunizados com as linhagens construídas produziram anticorpos e células T específicas para o antígeno testado (SBR). A partir desses ensaios, constatamos que linhagens de *L.innocua*, assim como as linhagens *B.subtilis* podem ser empregadas como veículos vacinais.

Como perspectiva para o trabalho feito, esperamos que as novas ferramentas geradas resultem no desenvolvimento de novas plataformas para a produção de proteínas recombinantes por meio de linhagens de *B. subtilis*. Além disso, os vetores gerados e os testes realizados em *L. innocua* abrem perspectivas importantes para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais baseadas em esporos/células recombinantes de *B. subtilis* e células vegetativas de *L. innocua*

REFERÊNCIAS¹

- AIRAKSINEN, U.; PENTTILA, T.; WAHLSTROM, E.; VUOLA, J.M.; PUOLAKKAINEN, M.; SARVAS, M. Production of *Chlamydia pneumoniae* proteins in *Bacillus subtilis* and their use in characterizing immune responses in the experimental infection model. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, p. 367-375, 2003.
- AMUGUNI, H.; TZIPORI, S. *Bacillus subtilis*: A temperature resistant and needle free delivery system of immunogens. **Hum. Vaccin. Immunother.**, v. 8, p. 979-986, 2012.
- AMUGUNI, J. H.; LEE, S.; KERSTEIN, K. O.; BROWN, D. W.; BELITSKY, B. R.; HERRMANN, J. E.; KEUSCH, G. T.; SONENSHEIN, A. L.; TZIPORI, S. Sublingually administered *Bacillus subtilis* cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. **Vaccine**, v. 29, p. 4778-4784, 2011.
- ANAGNOSTOPOULOS, C.; SPIZIZEN, J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 81, p. 741-746, 1961.
- BALABAN, N. Q.; MERRIN, J.; CHAIT, R.; KOWALIK, L.; LEIBLER, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. **Science**, v. 305, p. 1622–1625, 2004.
- BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nat. Biotechnol.**, v.22, p. 1399-1408, 2004.
- BIGGER, J. Treatment of staphylococcal infections with penicillin. **Lancet**, v. 2 p. 497–500, 1944.
- BILLMAN-JACOB, H. Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 7, p. 500–504, 1996.
- BIVER, S.; STEELS, S.; PORTETELLE, D.; VANDENBOL, M. *Bacillus subtilis* as a Tool for Screening Soil Metagenomic Libraries for Antimicrobial Activities **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 23, p. 850–855, 2013.
- BOERLIN, P.; ROCOURT, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D.; JACQUET, C.; PIFFARETTI, J.C. *Listeria ivanovii* subspecies *londoniensis*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 15, p. 42-46, 1992.

¹De acordo com:

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

BOLHUIS, A.; TJALSMA, H.; SMITH, H. E.; DE JONG, A.; MEIMA, R.; VENEMA, G.; BRON, S.; VAN DIJL, J. M. Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 2934–2941, 1999.

BOU-M'HANDI, N.; JACQUET, C.; EL MARRAKCHI, A.; MARTIN, P. Phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from a marine environment in Morocco. **Foodborne Path. Dis.**, v. 4, p. 409–417, 2007.

BRIGULLA, M.; HOFFMANN, T.; KRISP, A.; VÖLKER, A.; BREMER, E.; VÖLKER, U. Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low temperature adaptation. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 4305–4314, 2003.

BRITTON, R.A.; EICHENBERGER, P.; GONZALEZ-PASTOR, J.E.; FAWCETT, P.; MONSON, R.; LOSICK, R.; GROSSMAN, A.D. Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 4881–4890, 2002.

BROCKMEIER, U.; WENDORFF, M.; EGGERT, T. Versatile expression and secretion vectors for *Bacillus subtilis*. **Curr. Microbiol.**, v. 52, p. 143–148, 2006.

BRON, S.; MEIJER, W.; HOLSAPPEL, S.; HAIMA, P. Plasmid instability and molecular cloning in *Bacillus subtilis*. **Res. Microbiol.** v. 142, p. 875–883, 1991.

BRUAND, C.; EHRLICH, S. D. Transcription-driven DNA replication of plasmid pAM β 1 in *Bacillus subtilis*. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 135–145, 1998.

BRUAND, C.; LE CHATELIER, E.; EHRLICH, S. D.; AND JANNIÈRE, L. A fourth class of theta replicating plasmids: the pAM β 1 family from gram positive bacteria. **Sci. Proc. Nat. I. Acad.**, v. 90, p. 11668–11672, 1993.

CAVALCANTE, R. C. M. **Desenvolvimento de estratégias vacinais contra tumores induzidos pelo Vírus do Papiloma Humano tipo 16 (HPV-16) baseadas em linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis***. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHEN, L.; JAMES, L. P.; HELMANN, J. D. Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: Isolation and characterization of two genes differentially repressed by metal ions. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 5428–5437, 1993.

CHEN, L.; KERAMATI, L.; HELMANN, L.D. Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.92, p. 8190–8194, 1995.

CHEN, P.T.; SHAW, J.F. CHAO, Y.P., DAVID HO, T.H.; YU, S.M. Construction of Chromosomally Located T7 Expression System for Production of Heterologous Secreted Proteins in *Bacillus subtilis*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 5392–5399, 2010.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnol. Adv.**, v. 30, p. 1102–1107, 2012

CHOROBK, P.; CZAPLICKI, D.; OSSYSEK, K.; BERETA, J. *Salmonella* and cancer: from pathogens to therapeutics. **Acta Biochim. Pol.**, v. 60, p. 285–297, 2013.

CIABATTINI, A.; PARIGI, R.; ISTICATO, R.; OGGIONI, M.R.; POZZI, G. Oral priming of mice by recombinant spores of *Bacillus subtilis*. **Vaccine**, v. 22, p. 4139–43, 2004.

CLEWELL, D.B.; YAGI, Y.; DUNNY, G. M.; SCHULTZ, S. K. Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. **J. Bacteriol.**, v. 117, p. 283–289, 1974.

CURTISS, R. III. Bacterial infectious disease control by vaccine development. **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 1061–1066, 2002.

CUTTING, S. M.; HONG, H. A.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E. Oral vaccine delivery by recombinant spore probiotics. **Int. Rev. Immunol.**, v. 28, p. 487–505, 2009.

DAI, J. G.; XIE, H. W.; JIN, G.; WANG, W. G.; ZHANG, Y.; GUO, Y. Preliminary study on high-level expression of tandem-arranged tachyplesin-encoding gene in *Bacillus subtilis* WB800 and its antibacterial activity. **Mar. Biotechnol.**, v. 11, p. 109–117, 2009.

DE LAS HERAS, A.; CAIN, R. J.; BIELECKA, M. K.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 14, p. 118–127, 2011.

DINIZ, M. O.; LASARO, M. O.; ERTL, H.C.; FERREIRA, L. C. S. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding Human Papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to Herpesvirus glycoprotein D. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, p. 1576–1583, 2010.

DRAMSI, S.; BISWAS, I.; MAGUIN, E.; BRAUN, L.; MASTROENI, P.; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires the expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. **Mol. Microbiol.**, v. 16, p. 251–261, 1995.

DRAMSI, S.; LÉVI, S.; THRILLER, A.; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 4461–4468, 1998.

DREVETS, D. A.; SAWYER, R. T.; POTTER, T. A.; CAMPBELL, P. A. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4268–4276, 1995

DUBNAU, D.; LOSICK, R. Bistability in bacteria. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 564–572, 2006.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends Microbiol.**, v. 16, p. 269–275, 2008.

EFTINK, M. R. Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions. **Methods Enzymol.**, v. 278, p. 221–257, 1997.

EHRlich, S. D.; NOIROT, P.; PETIT, M. A.; JANNIERE, L.; MICHEL, B.; TE RIELE, H. Structural instability of *Bacillus subtilis* plasmids. In Setlow, J.K.; Hollaender, A. (Eds.), Genetic Engineering, Vol. 8. Plenum, New York, 1986, pp. 71–83.

EHRlich, S.D.; BRUAND, C.; SOZHAMANNAN, S.; DABERT, P.; GROS, M.F.; JANNIÈRE, L.; GRUSS, A. Plasmid replication and structural stability in *Bacillus subtilis*. **Res. Microbiol.**, v. 142, p. 869–73, 1991.

EYMAN, C.; HECKER, M. Induction of sigma(B)-dependent general stress genes by amino acid starvation in a spo0H mutant of *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 199, p. 221–227, 2001.

FAHNERT, B.; LILIE, H.; NEUBAUER, P. Inclusion bodies: formation and utilization. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 89, p. 93–142, 2004.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 476–511, 1991.

FERREIRA, L. C.; FERREIRA, R. C.; SCHUMANN, W. *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, p. 113–124, 2005.

FRIEDLY, E. C.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S.; O'BRYAN, C. A.; MARTIN, E. M.; BOYD, L. M. Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. **J. Food. Sci.**, v. 73, p. M174–M178, 2008.

FUANGTHONG, M.; HELMANN, J. D. Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 6348–6357, 2003.

FUANGTHONG, M.; HERBIG, A. F.; BSAT, N.; HELMANN, J. D. Regulation of the *Bacillus subtilis* *fur* and *perR* genes by PerR: Not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 3276–3286, 2002.

GAILLARD, J.- L.; BERCHE, P.; FREHEL, C.; GOUIN, E.; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. **Cell**, v. 65, p. 1127–1141, 1991.

GAT, O.; INBAR, I.; ALONI-GRINSTEIN, R.; ZAHAVY, E.; KRONMAN, C.; MENDELSON, I.; COHEN, S.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A. Use of a promoter trap system in *Bacillus anthracis*

and *Bacillus subtilis* for the development of recombinant protective antigen-based vaccines. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 801–813, 2003.

GIACHINI, M.; PIERLEONI, F. Anti-caries vaccines. **Minerva Stomatol.**, v.51, p. 251-62, 2002.

GLASER, P.; FRANGEUL, L.; BUCHRIESER, C.; RUSNIOK, C.; AMEND, A.; BAQUERO, F.; BERCHE, P.; BLOECKER, H.; BRANDT, P.; CHAKRABORTY, T.; CHARBIT, A.; CHETOUANI, F.; COUVE, E.; DE DARUVAR, A.; DEHOUX, P.; DOMANN, E.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; DUCHAUD, E.; DURANT, L.; DUSSURGET, O.; ENTIAN, K.D.; FSIHI, H.; GARCIA-DEL PORTILLO, F.; GARRIDO, P.; GAUTIER, L.; GOEBEL, W.; GOMEZ-LOPEZ, N.; HAIN, T.; HAUF, J.; JACKSON, D.; JONES, L.M.; KAERST, U.; KREFT, J.; KUHN, M.; KUNST, F.; KURAPKAT, G.; MADUENO, E.; MAITOURNAM, A.; VICENTE, J.M.; NG, E.; NEDJARI, H.; NORDSIEK, G.; NOVELLA, S.; DE PABLOS, B.; PEREZ-DIAZ, J.C.; PURCELL, R.; REMMEL, B.; ROSE, M.; SCHLUETER, T.; SIMOES, N.; TIERREZ, A.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; VOSS, H.; WEHLAND, J.; COSSART, P. Comparative genomics of *Listeria* species. **Science**, v. 294, p. 849–852, 2001.

GOULET, V.; BROHIER, S. Listeriosis in France in 1986: survey of hospital laboratories. **Pathol. Biol.**, v. 37, p. 206–211, 1989.

GRAU, F. H.; VANDERLINDE, P. B. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged beef. **J. Food Prot.** v. 53, p. 739–741, 1990.

GRAUMANN, P. L. Different genetic programmes within identical bacteria under identical conditions: the phenomenon of bistability greatly modifies our view on bacterial populations. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 560–563, 2006.

GRAVES, L. M.; HELSEL, L. O.; STEIGERWALT, A. G.; MOREY, R. E.; DANESHVAR, M. I.; ROOF, S. E.; ORSI, R. H.; FORTES, E. D.; MILLILO, S. R.; DEN BAKKER, H. C.; WIEDMANN, M.; SWAMINATHAN, B.; SAUDERS, B. D. *Listeria marthiisp. nov.*, isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.60, p. 1280–1288, 2009.

GRUSS, A.; EHRLICH, S. D. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmid. **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 231-241, 1989.

GUO, M.; JIN, T. Z.; SCULLEN, O. J.; SOMMERS, C. H. Effects of Antimicrobial Coatings and Cryogenic Freezing on Survival and Growth of *Listeria innocua* on Frozen Ready-to-Eat Shrimp during Thawing. **J. Food Sci.**, v. 78, p. M1195-M1200, 2013.

GUZMAN, C. A.; ROHDE, M.; CHAKRABORTY, T.; DOMANN, E.; HUDEL, M.; WEHLAND, J.; TIMMIS, K. N. Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3665–3673, 1995.

HALDENWANG, W.G. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p.1-30, 1995.

HAMBRAEUS, G.; KARHUMAA, K.; RUTBERG, B. A 5' stem-loop and ribosome binding site but not translation are important for the stability of *Bacillus subtilis aprE* leader mRNA. **Microbiology**, v. 148, p.1795–1803, 2002.

HARWOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends Biotechnol.**, v. 10, p. 247-256, 1992.

HARWOOD, C. R.; CRANENBURGH, R. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. **Trends Microbiol.**, v. 16, p. 73–79, 2008.

HEMBERGER, S.; PEDROLI, D.B.; STOLZ, J.; VOGL, C.; LEHMANN, M.; MACK, M. RibM from *Streptomyces davawensis* is a riboflavin/roseoflavin transporter and may be useful for the optimization of riboflavin production strains. **BMC Biotechnol.**, v. 11, p. 119, 2011.

HERAVI, M. K.; WENZEL, M.; ALTENBUCHNER, J. Regulation of *mtl* operon promoter of *Bacillus subtilis*: Requirements of its use in expression vectors. **Microb. Cell Fact.**, v. 10, p.83, 2011.

HESS, B. M.; XUE, J.; MARKILLIE, L. M.; TAYLOR, R. C.; WILEY, H. S.; AHRING, B. K.; LINGGI, B. Coregulation of Terpenoid Pathway Genes and Prediction of Isoprene Production in *Bacillus subtilis* Using Transcriptomics. **PLoS ONE**, v. 8, p. e66104, 2013.

HIGGINS, D. E.; SHASTRI, N.; PORTNOY, D. A. Delivery of protein to the cytosol of macrophages using *Escherichia coli* K-12. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 1631–1641, 1999.

HIMANEN, J.P.; TAIRA, S.; SARVAS, M.; SARIS, P.; RUNEBERG-NYMAN, K. Expression of pertussis toxin subunit S4 as an intracytoplasmic protein in *Bacillus subtilis*. **Vaccine**, v. 8, p. 600–604, 1990.

HORTON, R. M.; HUNT, H. D.; HO, S. N.; PULLEN, J. R.; PEASE, L. B. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. **Gene**, v. 77, p. 61-68, 1989.

HUANG, Y.M.; HU, W.; RUSTANDI, E.; CHANG, K.; YUSUF-MAKAGIANSAR, H.; RYLL, T. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. **Biotechnol. Prog.**, v. 26, p. 1400–1410, 2010.

IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, I.; MUTTILAINEN, S.; WAHLSTRÖM, E.; SAARINEN, L.; LEINONEN, M.; SARVAS, M.; MÄKELÄ, P. H. The antibody response to a prototype liposome vaccine

containing *Neisseria meningitidis* outer membrane protein P1 produced in *Bacillus subtilis*. **Vaccine**, v.13, p. 1501–1508, 1995.

IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, I.; WAHLSTRÖM, E.; MUTTILAINEN, S.; NURMINEN, M.; KAYHTY, H. SARVAS, M.; MÄKELÄ, P. H. Immunization with meningococcal class 1 outer membrane protein produced by *Bacillus subtilis* and reconstituted in the presence of Zwittergent or Triton X-100. **Vaccine**, v. 14, p. 886–891, 1996.

IGOSHIN, O. A.; BRODY, M. S.; PRICE, C. W.; SAVAGEAU, M. A. Distinctive topologies of partner-switching signaling networks correlate with their physiological roles. **J. Mol. Biol.**, v. 369, p. 1333-1352, 2007.

ILK, N.; SCHUMI, C. T.; BOHLE, B.; EGELSEER, E. M.; SLEYTR, U.B. Expression of an endotoxin-free S-layer/allergen fusion protein in gram-positive *Bacillus subtilis* 1012 for the potential application as vaccines for immunotherapy of atopic allergy. **Microb. Cell Fact.**, v. 10 p. 6, 2011.

JAACKS, K. J.; HEALY, J.; LOSICK, R.; GROSSMAN, A. D. Identification and characterization of genes controlled by the sporulation-regulatory gene *spo0H* in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 4121-41299, 1989.

JAN, J.; VALLE, F.; BOLIVAR, F.; MERINO, E. Construction of protein overproducer strains in *Bacillus subtilis* by an integrative approach. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 55, p. 69-75, 2001.

JANNIERE, L.; GRUSS, A.; EHRLICH, S. D. Biochemistry, physiology and molecular genetics. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. (Ed.). **Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria**. Washington, DC: American Society for Microbiology 1993. p. 625-644. (1993)

JOHNSON, W. C.; MORAN, C. P. J.; LOSICK, R. Two RNA polymerase sigma factors from *Bacillus subtilis* discriminate between overlapping promoters for a developmentally regulated gene. **Nature**, v. 302, p. 800-804, 1983.

JURGEN, B.; SCHWEDER, T.; HECKER, M. The stability of mRNA from the *gsiB* gene of *Bacillus subtilis* is dependent on the presence of a strong ribosome binding site. **Mol. Gen. Genet.**, v.258, p. 538–545, 1998.

KALTWASSER, M.; WIEGERT, T.; SCHUMANN, W. Construction and application of Epitope and green fluorescent protein-tagging Integration vectors for *Bacillus subtilis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p. 2624–2628, 2001.

KANE, J.K.; HARTLEY, D.L. Properties of recombinant protein-containing inclusion bodies in *E. coli*. In: SEETHARAM, R.; SHARMA, S. K. (Ed.). **Purification and Analysis of Recombinant Proteins**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 121-145.

KEARNS R. J.; HINRICHS, D. J. Kinetics and maintenance of acquired resistance in mice to *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.**, v. 16, p. 923–927, 1977.

KEGGINS, K. M.; LOVETT, P. S.; DUVAL, E. J. Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus* DNA in *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pUB110. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 75 p. 1423–1427, 1978.

KELLY, C. G.; TODRYK, S.; KENDAL, H. L.; MUNRO, G. H.; LEHNER, T. T-cell, adhesion, and B-cell epitopes of the cell surface *Streptococcus mutans* protein antigen I/II. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3649–3658, 1995.

KOEHN, J.; HUNT, I. High-throughput protein production (HTPP): a review of enabling technologies to expedite protein production. **Methods Mol. Biol.**, v. 498, p. 1–18, 2009.

KOGA, T.; OKAHASHI, N.; TAKAHASHI, I.; KANAMOTO, T.; ASAKAWA, H.; IWAKI, M. Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 289–296, 1990

KOVÁCS, T.; HARGITAI, A.; KOVÁCS, K. L.; MÉCS, I. pH dependent activation of the alternative transcriptional factor σB in *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 165, p. 323–328, 1998.

KROLL, J.; KLINTER, S.; SCHNEIDER, C.; VOB, I.; STEINBUCHER, A. Plasmid addition systems: perspectives and applications in biotechnology. **Microb. Biotechnol.**, v. 3, p. 634–657, 2010.

KUHN, M.; KATHARIOU, S.; GOEBEL, W. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 79–82, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAGODICH, A. V.; SHTANIUK, YA. V.; PROZOROV, A. A.; TITOK, M.A. The replication system of plasmids from *Bacillus subtilis* environmental isolates. **Mol. Biol.**, 2004, v. 38, p. 437–441, 2004

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York:Kluwer Academic/Plenum, 1999.

LASARO, M. O.; DINIZ, M. O.; REYES-SANDOVAL, A.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of Human Papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. **Microb. Infect.** v. 7, p. 1541–1550, 2005.

LAVELLE, E. C.; O'HAGAN, D. T. Delivery systems and adjuvants for oral vaccines. **Expert. Opin. Drug Deliv.**, v. 3, p. 747–762, 2006.

LECUIT, M., DRAMSI, S.; GOTTARDI, C.; FEDOR-CHAIKEN, M.; GUMBINER, B.; COSSART, P. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. **EMBO. J.**, v. 18, p. 3956–3963, 1999.

LECUIT, M.; OHAYON, H.; BRAUN, L.; MENGAUD, J.; COSSART, P. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 5309–5319, 1997.

LEE, S.; BELITSKY, B. R.; BRINKER, J. P.; KERSTEIN, K. O.; BROWN, D. W.; CLEMENTS, J. D.; KEUSCH, G. T.; TZIPORI, S.; SONENSHEIN, A. L.; HERRMANN, J. E. Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, p. 1647–1655, 2010a.

LEE, S.; BELITSKY, B. R.; BROWN, D. W.; BRINKER, J. P.; KERSTEIN, K. O.; HERRMANN, J. E.; KEUSCH, G. T.; SONENSHEIN, A. L.; TZIPORI, S. Efficacy, heat stability and safety of intranasally administered *Bacillus subtilis* spore or vegetative cell vaccines expressing tetanus toxin fragment C. **Vaccine**, v. 28, p. 6658–6665, 2010b.

LEHNER, T.; CHALLACOMBE, S.J.; CALDWELL, J. An experimental model for immunological studies of dental caries in the rhesus monkey. **Archs. oral Biol.**, v. 20, p. 299–304, 1975.

LI, W.; ZHOU, X.; LU, P. Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. **Res. Microbiol.** v. 155 p. 605–610, 2004.

LU, Y.; LIN, Q.; WANG, J.; WU, Y.; BAO, W.; LV, F.; LU, Z. Overexpression and characterization in *Bacillus subtilis* of a positionally nonspecific lipase from *Proteus vulgaris*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 37, p. 919–925, 2010.

LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C.; PACCEZ, J. D.; SOUZA, R. D.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, R. C.; FERREIRA, L. C. Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. **Vaccine**, v. 26, p. 3998–4005, 2008.

MAGALHAES, P. O.; LOPES, A. M.; MAZZOLA, P. G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T. C.; PESSOA, A. J. Methods of endotoxin removal from biological preparations: A review. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 10, p. 388–404, 2007.

MAUL, B.; VÖLKER, U.; RIETHDORF, S.; ENGELMANN, S.; HECKER, M. σ B-dependent regulation of *gsiB* in response to multiple stimuli in *Bacillus subtilis*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 248, p. 114–120, 1995.

MAURIELLO, E. M.; DUC, I. H.; ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; HONG, H. A.; DE, F. M.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. **Vaccine**, v. 22, p. 1177–1187, 2004.

MEIJER, W. J. J.; VAN DER LELIE, D.; VENEMA, G.; BRON, S. (1995b) Effects of the generation of single-stranded DNA on the maintenance of plasmid pMV158 and derivatives in different *Bacillus subtilis* strains. **Plasmid**, v. 33, p. 79–89.

MOGK, A.; HAYWARD, R.; SCHUMANN, W. Integrative vectors for constructing single-copy transcriptional fusions between *Bacillus subtilis* promoters and various reporter genes encoding heat-stable enzymes. **Gene**, v. 182, p. 333–366, 1996.

MORRISON, D.C.; SILVERSTEIN, R.; LUCHI, M.; SHNYRA, A. Structure–function relationships of bacterial endotoxins. Contribution to microbial sepsis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 13, p. 313–340, 1999

MÜLLER, J.; OEHLER, S.; MÜLLER-HILL, B. Repression of *lac* promoter as a function of distance, phase and quality of an auxiliary *lac* operator. **J. Mol. Biol.**, v. 257, p. 21–29, 1996.

MURASHIMA, K.; CHEN, C.-L.; KOSUGI, A.; TAMARU, Y.; DOI, R.H.; WONG, S.-L. Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* *engB*, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 76–81, 2002.

NANNAPANENI, P.; HERTWIG, F.; DEPKE, M.; HECKER, M.; MÄDER, U.; VÖLKER, U.; STEIL, L.; VAN HIJUM, S. A. F. T. Defining the structure of the general stress regulon of *Bacillus subtilis* using targeted microarray analysis and Random Forest Classification. **Microbiology**, v. 158, p. 696–707, 2012.

NEUTRA, M. R.; KOZLOWSKI, P.A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge, **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 148–158, 2006.

NGUYEN, H. D.; NGUYEN, Q. A.; FERREIRA, R. C.; FERREIRA, L. C.; TRAN, L. T.; SCHUMANN, W. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. **Plasmid**, v. 54, p. 241–248, 2005.

NGUYEN, H. D.; PHAN, T. T.; SCHUMANN, W. Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **Curr. Microbiol.**, v. 55, p. 89–93, 2007.

NGUYEN, T. T.; QUYEN, T. D.; LE, H. T. Cloning and enhancing production of a detergent- and organic-solvent-resistant nattokinase from *Bacillus subtilis* VTCC-DVN-12-01 by using an eight-protease-gene-deficient *Bacillus subtilis* WB800. **Microb. Cell Fact.**, v. 12, p. 79, 2013.

NOVICK, R. P. Staphylococcal plasmids and their replication. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 43, p. 537–565, 1989.

NURMINEN, M.; BUTCHER, S.; IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, I.; WAHLSTRÖM, E.; MUTTILAINEN, S.; RUNEBERG-NYMAN, K.; SARVAS, M.; MÄKELÄ, P. H. The class1 outer membrane protein of

Neisseria meningitidis produced by *Bacillus subtilis* can give rise to protective immunity. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 2499–2506, 1992.

OULTRAM, J. D.; LOUGHLIN, M.; SWINFIELD, T. J.; BREHM, J. K.; THOMPSON, D. E.; MINTON, N. P. Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 56, p. 83–88, 1988.

PABST, M.J.; JOHNSTON, R.B. **Bacterial LPS: a mediator of inflammation**. In: Henson, P.M.; Murphy, R.C. Editors, 1989. **Handbook of Inflammation 6**. Elsevier, Amsterdam, pp. 361–393.

PACCEZ, J. D.; LUIZ, W. B.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, R. C.; SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. Stable episomal expression system under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of *Bacillus subtilis* as a vector for antigen delivery. **Vaccine**, v. 24, p. 2935–2943, 2006.

PACCEZ, J. D.; NGUYEN, H. D.; LUIZ, W. B.; FERREIRA, R. C.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; SCHUMAN, W.; FERREIRA, L. C. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. **Vaccine**, v. 25, p. 4671–4680, 2007.

PARK, S. F.; STEWART, G. S. A. B. High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. **Gene**, v. 94, p. 129–132, 1990.

PERMPOONPATTANA, P.; HONG, H. A.; PHETCHARABURANIN, J.; HUANG, J. M.; COOK, J.; FAIRWEATHER, N. F.; CUTTING, S. M. Immunization with *Bacillus* spores expressing toxin A peptide repeats protects against infection with *Clostridium difficile* strains producing toxins A and B. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 2295–2302, 2011.

PERRIN, M.; BEMER, M.; DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5308–5309, 2003.

PETERSOHN, A.; BRIGULLA, M.; HAAS, S.; HOHEISEL, J. D.; VOLKER, U.; HECKER, M. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 5617–5631, 2001.

PHAN, T. T. P.; NGUYEN, H. D.; SCHUMANN, W. Establishment of a simple and rapid method to screen for strong promoters in *Bacillus subtilis*. **Protein Expr. Purif.**, v. 71: p. 174–178, 2010.

PHAN, T.T.P.; NGUYEN, H.D.; SCHUMANN, W. Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements. **J. Biotechnol.**, v. 157 p. 167–172, 2012.

PHUONG, N. D.; JEONG, Y.S.; SELVARAJ, T.; KIM, S. K.; KIM, Y. H.; JUNG, K. H.; KIM, J.; YUN, H. D.; WONG, S. L.; LEE, J.K.; KIM, H. Production of XynX, a large multimodular protein of *Clostridium thermocellum*, by protease-deficient *Bacillus subtilis* strains. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 168, p. 375–382, 2012.

POHL, S.; HARWOOD, C. R. Heterologous protein secretion by *Bacillus* species from the cradle to the grave. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 73, p. 1-25, 2010.

PORCHIA, B. F. M. M.; DINIZ, M. O.; CARIRI, F. A. M. O.; SANTANA, V. C, AMORIM, J.H.; BALAN, A; BRAGA, C. J. M; FERREIRA, L. C. S. purified Herpes Simplex type 1 glycoprotein D (gD) genetically fused with the type 16 Human Papillomavirus E7 oncoprotein enhances antigen-specific CD8(+) T cell responses and confers protective antitumor immunity. **Mol. Pharm.**, v. 8, p. 2320–2330, 2011.

PORTNOY, D. A.; CHAKRABORTY, T.; GOEBEL, W.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1263-1267, 1992.

PRICE, C. W.; FAWCETT, P.; CEREMONIE, H.; SU, N.; MURPHY, C. K.; YOUNGMAN, P. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 757-774, 2001.

QUISEL, J. D.; BURKHOLDER, W. F.; GROSSMAN, A. D. In vivo effects of sporulation kinases on mutant Spo0A proteins in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v.183, p. 6573–6578, 2001.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; BIONDO, R.; QUADROS, O. D. F.; VICENTE, E. J.; SCHENBERG, A. C. G. A metal-repressed promoter from gram-positive *Bacillus subtilis* is highly active and metal-induced in gram-negative *Cupriavidus metallidurans*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 107, p. 469–477, 2010.

ROCHA, P. R.; DALMASSO, A.; GRATTAROLA, C.; CASALONE C.; DEL PIERO, F.; BOTTERO, M. T.; CAPUCCHIO, M. T. Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. **Res. Vet. Sci.**, v. 94, p. 111-114, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor, 2001.

SAMUELSON, J.C. Recent developments in difficult protein expression: a guide to *E. coli* strains, promoters, and relevant host mutations. **Methods Mol. Biol.**, v.705, p. 195-209, 2011.

SANDERSON, S.; SHASTRI, N. LacZ inducible, anti- gen/MHC-specific T cell hybrids. **Int. Immunol.**, v. 6, p. 369–376, 1994.

SANDERSON, S.; SHASTRI, N. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. **Inter. Immu.**, v. 6, p. 369-376, 1994.

SAUDERS, B. D.; DURAK, M. Z.; FORTES, E.; WINDHAM, K.; SCHUKKEN, Y.; LEMBO, A. J. J.; AKEY, B.; NIGHTINGALE, K.K.; ANDWIEDMANN, M. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from natural and urban environments. **J. Food Prot.**, v. 69, p. 93–105, 2006.

SAUDERS, B. D.; OVERDEVEST, J.; FORTES, E.; WINDHAM, K.; SCHUKKEN, Y.; LEMBO, A.; WIEDMANN, M. Diversity and ecology of *Listeria* species in urban and natural environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 4420–4433, 2012.

SCHMID, M. W.; NG, E. Y. W.; LAMPIDIS, R.; EMMERTH, M.; WALCHER, M.; KREFT, J.; GOEBEL, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K. H. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 1–18, 2005.

SCHMIDT, A.; SCHIESSWOHL, M.; VÖLKER, U.; HECKER, M.; SCHUMANN, W. Cloning, sequencing, mapping, and transcriptional analysis of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 3993–3999, 1992.

SCHOLZ, Q.; THIEL, A.; HILLEN, W.; NIEDERWEIS, M. Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 1565–1570, 2000.

SCHUMANN, W. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 62, p. 137–189, 2007.

SCHWEDER, T.; KOLYSCHKOW, A.; VÖLKER, U.; HECKER, M. Analysis of the expression and function of the sigmaB-dependent general stress regulon of *Bacillus subtilis* during slow growth. **Arch. Microbiol.**, v. 171, p. 439–443, 1999.

SCORTTI, M.; MONZO, H.J.; LACHARME-LORA, L.; LEWIS, D.A.; VAZQUEZ- BOLAND, J.A. The PrfA virulence regulon. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 1196–1207, 2007.

SECHI, A. S.; WEHLAND, J.; SMALL, J. V. The isolated comet tail pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: a tail of two actin filament populations, long and axial and short and random. **J. Cell Biol.**, v. 137, p. 155–167, 1997.

SERRANO-HERAS, G.; SALAS, M.; BRAVO, A. A new plasmid vector for regulated gene expression in *Bacillus subtilis*. **Plasmid**, v. 54, p. 278–282, 2005.

SEYDLOVA, G.; HALADA, P.; FISER, R.; TOMAN, O.; ULRYCH, A.; SVOBODOVÁ, J. DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress. **J. Appl. Microbiol.**, v. 112, p. 765–774, 2012.

SHARP, P.M.; COWE, E.; HIGGINS, D.G.; SHIELDS, D.C.; WOLFE, K.H.; WRIGHT, F. Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within species diversity. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 8207–8211, 1988.

- SHEN, A.; HIGGINS, D. E. The 5' untranslated region-mediated enhancement of intracellular listeriolysin O production is required for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. **Mol. Microbiol.**, v. 57, p. 1460-1473, 2005.
- SINGH, R.; WALLECHA, A. Cancer immunotherapy using recombinant *Listeria monocytogenes*: transition from bench to clinic. **Hum. Vaccin.**, v. 7, p. 497-505, 2011.
- SOMMERS, C. H.; COOKE, P. H.; FAN, X.; SITES, J. E. Ultraviolet light (254 nm) inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters that contain potassium lactate and sodium diacetate. **J. Food Sci.**, v. 74, p. M114-M119, 2009.
- SONG, B. H.; NEUHARD, J. Chromosomal location, cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *cdd* gene encoding cytidine/deoxycytidine deaminase. **Mol. Gen. Genet.**, v. 216, p. 462-468, 1989.
- STOJANOV, M.; SAKWINSKA, O.; MOREILLON, P. Expression of SCCmec cassette chromosome recombinases in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 68, p. 749-757, 2013.
- SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microb. Infect.**, v. 9, p. 1236-1243, 2007.
- TANAKA, T.; KOSHIKAWA, T. Isolation and characterization of four types of plasmids from *Bacillus subtilis* (natto). **J. Bacteriol.**, v. 131, p. 699-701, 1977.
- TAVARES, M. B.; SILVA, B. M.; CAVALCANTE, R. C.; SOUZA, R. D.; LUIZ, W. B.; PACCEZ, J. D.; CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; FERREIRA, L. C.; FERREIRA, R. C. Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of Streptococcus mutans P1 protein produced by a recombinant *Bacillus subtilis* strain. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 59, p. 131-142, 2010.
- TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 72, p. 211-222, 2006.
- THERIOT, J. A.; MITCHISON, T. J.; TILNEY, L. G.; PORTNOY, D. A. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. **Nature**, v. 357, p. 257-260, 1992.
- THOMPSON, R. J.; BOUWER, H. G.; PORTNOY, D. A.; FRANKEL, F. R. Pathogenicity and immunogenicity of a *Listeria monocytogenes* strain that requires D-alanine for growth. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3552-3561, 1998.

TITOK, M. A.; CHAPUIS, J.; SELEZNEVA, Y. V.; LAGODICH, A. V.; PROKULEVICH, V. A.; EHRLICH, S. D.; JANNIERE, L. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector. **Plasmid**, v. 49, p. 53–62, 2003.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 509–544, 1998.

UOZUMI, T.; OZAKI, A.; BEPPU, T.; ARIMA, K. New cryptic plasmid of *Bacillus subtilis* and restriction analysis of other plasmids found by general screening. **J. Bacteriol.**, v. 142 p. 315–318, 1980.

VAN DIJL, J. M.; HECKER, M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. **Microb. Cell Fact.**, v. 12, p. 3, 2013.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 584–640, 2001.

VEENING, J. W.; SMITS, W.K.; KUIPERS, O.P. Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 193–210, 2008.

VOELKER, U.; VOELKER, A.; MAUL, B.; HECKER, M.; DUFOUR, A.; HALDENWANG, W. G. Separate mechanisms activate σ^B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 3771–3780, 1995.

VOLKER, U.; ENGELMANN, S.; MAUL, B.; RIETHDORF, S.; VÖLKER, A.; SCHMID, R.; MACH, H.; HECKER, M. Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v. 140, p. 741–752, 1994.

VOLKER, U.; MACH, H.; SCHMID, R.; HECKER, M. Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 138, p. 2125–2135, 1992.

WANG, P. Z.; DOI, R. H. Overlapping promoters transcribed by *Bacillus subtilis* sigma 55 and sigma 37 RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phases. **J. Biol. Chem.**, v. 10, p. 8619–8625, 1984.

WEHRL, W.; NIEDERWEIS, M.; SCHUMANN, W. The FtsH protein accumulates at the septum of *Bacillus subtilis* during cell division and sporulation. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 3870–3873, 2000.

WELLS, J. Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria. **Ann. Rev. Food Sci. Technol.**, v. 2, p. 423–452, 2011.

WENZEL, M.; MÜLLER, A.; SIEMANN-HERZBERG, M.; ALTENBUCHNER, J. Self-inducible *Bacillus subtilis* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, p. 6419–6425, 2011.

- WESTERS, L.; DIJKSTRA, D. S.; WESTERS, H.; VAN DIJL, J. M.; QUAX, W. J. Secretion of functional human interleukin-3 from *Bacillus subtilis*. **J. Biotechnol.**, v. 123, p. 211-224, 2006.
- WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1694, p. 299-310, 2004.
- WIRTH, R.; AN, F. Y.; CLEWELL, D. B. Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S.faecalis* shuttle vector. **J. Bacteriol.**, v. 165, p. 831-836, 1986.
- WOOD, S.; MAROUSHEK, N.; CZUPRINSKI, C. J. Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3068-3072, 1993.
- WU, S.-C.; WONG, S.-L. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. **J. Biotechnol.**, v. 72, p. 188-195, 1999.
- WU, X.-C.; LEE, W.; TRAN, L.; WONG, S.-L. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 4952-4958, 1991.
- XIA, Y.; CHEN, W.; ZHAO, J. X.; TIAN, F. W.; ZHANG, H.; DING, X. L. Construction of a new food-grade expression system for *Bacillus subtilis* based on theta replication plasmids and auxotrophic complementation. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 76, p. 643-650, 2007.
- YE, R.; KIM, J. H.; KIM, B. G.; SZARKA, S.; SIHOTA, E.; WONG, S.L. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 62, p. 87-96, 1999.
- YE, R.; YANG, L. P.; WONG, S.-L. **Proceedings of the International Symposium on Recent Advances in Bioindustry**. Seoul, Korea: The Korean Society for Applied Microbiology; 1996. Construction of protease-deficient *Bacillus subtilis* strains for expression studies: inactivation of seven extracellular proteases and the intracellular LonA protease; pp. 160-169.
- YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERRLER, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **J. Biotechnol.**, v. 127, p. 335-347, 2007.
- YING, Q.; ZHANG, C.; GUO, F.; WANG, S.; BIE, X.; LU, F.; LU, Z. Secreted expression of a hyperthermophilic α -amylase gene from *Thermococcus* sp HJ21 in *Bacillus subtilis*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 392-398, 2013.
- YOUNSON, J.; KELLY, C. The rational design of an anti-caries peptide against *Streptococcus mutans*. **Mol. Divers.**, v. 8, p. 121-126, 2004.

ZHANG, C.; TAO, T.; YING, Q.; ZHANG, D.; LU, F.; BIE, X.; LU, Z. Extracellular production of lipoxygenase from *Anabaena* sp. PCC 7120 in *Bacillus subtilis* and its effect on wheat protein. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 94, p. 949–958, 2012.

ZUBER, P.; HEALY, J.M.; LOSICK, R. Effects of plasmid propagation of a sporulation promoter on promoter utilization and sporulation in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v.169, p. 461-469, 1987.

APÊNDICE - Atividades acadêmicas desenvolvidas durante o período de doutorado

1- Artigos científicos publicados

Tavares, Milene B. ; Souza, Renata D. ; Luiz, Wilson B. ; **CAVALCANTE, RAFAEL C. M.** ; CASAROLI, CAROLINE ; MARTINS, EDUARDO G. ; FERREIRA, RITA C. C. ; FERREIRA, LUÍS C. S. ***Bacillus subtilis* Endospores at High Purity and Recovery Yields: Optimization of Growth Conditions and Purification Method. Current Microbiology (Print) , v. 1112, p. Nov2012, 2012.**

Amorim, Jaime Henrique ; Porchia, Bruna F.M.M. ; Balan, Andrea ; **CAVALCANTE, R. C. M.** ; da Costa, Simone Moraes ; de Barcelos Alves, Ada Maria ; Ferreira, Luís Carlos de Souza. **Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in Escherichia coli preserves structural and immunological properties of the native protein. Journal of Virological Methods , v. 167, p. 186-192, 2010.**

Tavares, Milene B. ; Silva, Bruno M. ; **Cavalcante, Rafael C.M.** ; Souza, Renata D. ; Luiz, Wilson B. ; Paccez, Julianio D. ; Crowley, Paula J. ; Brady, L. Jeannine ; Ferreira, Luís C.S. ; Ferreira, Rita C.C. **Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of Streptococcus mutans P1 protein produced by a recombinant Bacillus subtilis strain. FEMS Immunology and Medical Microbiology (Print) , v. 59, p. 131-142, 2010.**

Luiz, Wilson B. ; **Cavalcante, Rafael C.M.** ; Paccez, JulianioD. ; Souza, Renata D. ; Sbrogio-Almeida, Maria E. ; Ferreira, Rita C.C. ; Ferreira, Luis C.S. **Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant Bacillus subtilis strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. Vaccine (Guildford) , v. 26, p. 3998-4005, 2008.**

2- Patente Requerida

FERREIRA, LUÍS C. S. ; FERREIRA, RITA C. C. ; Luiz, Wilson B. ; Tavares, Milene B. ; Souza, Renata D. ; **CAVALCANTE, R. C. M.** SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO RECOMBINANTE QUE CODIFICA PARA OS AMINOÁCIDOS 39 A 512 DA PROTEÍNA P1 DO S.MUTANS, PROTEÍNA RECOMBINANTE E SEUS USOS NA PREVENÇÃO E CONTROLE DA CÁRIE DENTAL. 2011, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI11036729, data de depósito: 10/03/2011, título: "SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO RECOMBINANTE QUE CODIFICA PARA OS AMINOÁCIDOS 39 A 512 DA PROTEÍNA P1 DO S.MUTANS, PROTEÍNA RECOMBINANTE E SEUS USOS NA PREVENÇÃO E CONTROLE DA CÁRIE DENTAL" , Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

3- Resumos publicados em anais de eventos

Luiz, Wilson B.; Tavares, Milene B. ; Souza, Renata D. ; CASAROLI, CAROLINE ; **Cavalcante, R. C. M.** ; Ferreira, Rita C. C. ; Ferreira, Luís C. S. . Isolation of Bacillus subtilis endospores at high purity and great performance in recovery Yields: optimization of growth conditions and purification method. 2012. American Society for Microbiology , California, USA

Tavares, Milene B. ; Paccez, Juliano D. ; Souza, Renata D. ; **Cavalcante, R. C. M.** ; Luiz, Wilson B. ; Ferreira, RITA C. C. ; Ferreira, Luís C. S. . Anti-caries vaccines based on recombinant Bacillus subtilis spores expressing bacterial adhesins and the N terminal region of the Streptococcus mutans P1 surface protein. 2012. American Society for Microbiology , California, USA

Cavalcante, R. C. M. ; Tavares, Milene B. ; Nguyen, Q. A. ; Souza, Renata D. ; LUIZ, W. B. ; Schumann, W. ; Ferreira, RITA C. C. ; Ferreira, LUÍS C. S. . Bacillus subtilis spores as a platform to express and purify recombinant heterologous proteins. 2012. European Spore Conference, London, UK

Tavares, Milene B. ; Paccez, Juliano D. ; Souza, Renata D. ; **Cavalcante, R. C. M.** ; LUIZ, W. B. ; Ferreira, Rita C.C. ; FERREIRA, LUÍS C. S. . Enhancement of Mucosal and Systemic Immunogenicity of The N-terminal Region of the Streptococcus mutans P1 Surface Protein using an anti-caries vaccine based on adhesive Bacillus subtilis spores. 2012. European Spore Conference, London, UK

Souza, Renata D. ; Tavares, Milene B. ; Luiz, W. B. ; **Cavalcante, R. C. M.** ; Martins, Eduardo G. ; Ferreira, Rita C. C. ; Ferreira, LUÍS C. S. . Influence of Growth Conditions and Isolation Method on the Purity and Recovery Yields of Bacillus subtilis Endospores. 2012. European Spore Conference, London, UK

Tavares, Milene B. ; Souza, Renata D. ; **Cavalcante, R. C. M.** ; Luiz, Wilson B. ; Martins, Eduardo G. ; Ferreira, Rita C. C. ; Ferreira, Luís C. S. . Anti-caries vaccines based on recombinant *Bacillus subtilis* spores expressing bacterial adhesins and the N terminal region of the *Streptococcus mutans* P1 surface protein. 2012. Reunião Científica do ICB, Universidade de São Paulo, São Paulo -SP.

Tavares, Milene B. ; Paccez, Juliano D. ; Souza, Renata D. ; **Cavalcante, R. C.M.** ; LUIZ, W. B. ; Ferreira, Rita C.C. ; Ferreira, Luís C. S. . Expression of bacterial adhesins on the spore coat enhance the immunogenicity of *Bacillus subtilis* endospores as orally delivered vaccine vectors. 2011. Gram-positive Bacteria Congress, Tuscany, Italy.

Martins, Eduardo G. ; Tavares, Milene B. ; Luiz, Wilson B. ; Souza, Renata D. ; Cavalcante, R. C. M. ; Ferreira, RITA C. C. ; Ferreira, Luís C. S. Influence of Growth Conditions and Isolation Method on the Purity and Recovery Yields of *Bacillus subtilis* Endospores. 2011. Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu-PR

Souza, Renata D. ; **Cavalcante, R. C. M.** ; Tavares, Milene B. ; Luiz, Wilson B. ; Ferreira, LUÍS C. S. . Modulação da Resposta Imune por meio de vetores bacterianos Gram-positivos. 2010. I Workshop de Vacinas e Fisiologia Bacteriana. Juréia - SP

Tavares, Milene B. ; Silva, Bruno M. ; **CAVALCANTE, R. C. M.** ; Souza, Renata D. ; Luiz, Wilson B. ; Paccez, Juliano D. ; Crowley, Paula J. ; Brady, L. Jeannine ; Ferreira, Luís C.S. ; Ferreira, Rita C.C. . Expression and Characterization of N-terminal region of the protein P1 of *Streptococcus mutans* produced by recombinant strain of *Bacillus subtilis*. 2010. American Society for Microbiology San Diego, CA USA.

Tavares, Milene B. ; Paccez, Juliano D. ; **Cavalcante, R. C. M.** ; Souza, Renata D. ; FERREIRA, LUÍS C. S. ; SCHUMANN, W. ; FERREIRA, RITA C. C. . Construção de um novo sistema de expressão e purificação de proteínas recombinantes baseados em esporos de *Bacillus subtilis*. 2009. IX Reunião Científica do Departamento de Microbiologia ICB-USP. São Paulo -SP.

Luiz, Wilson B. ; Paccez, Juliano D. ; **Cavalcante, R. C. M.** ; Souza, Renata D. ; Ferreira, Rita C.C. ; Schumann, W. ; Ferreira, Luís C. S. . Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. 2008. American Society for Microbiology. Boston, MA USA

4- Participação em disciplinas e cursos de graduação e pós-graduação

4.1 Pós-graduação *stricto sensu*

Disciplina BMM5801 Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Participação na Disciplina Vacinas e a Microbiologia apresentando o módulo de Imunidade de Mucosas na Disciplina de Pós-Graduação BMM5801. A referida disciplina é oferecida com a periodicidade de dois anos pelo Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo e está sob a coordenação do Professor Luís Carlos de Souza Ferreira.

4.2 Pós-graduação *latu sensu*

Curso de Especialização em Microbiologia

Entidade Promotora: Sociedade Brasileira de Microbiologia SBM

Período de exercício profissional: 2009 a 2013.

Curso de Especialização em Genética e Biologia Molecular

Entidade Promotora: Instituto de Pós-graduação Médica do Rio de Janeiro - IPGMRJ

Período de exercício profissional: 2007 a 2008.

4.3 Graduação

4.3.1 Disciplina BMM0271 Microbiologia Básica do Departamento de Microbiologia Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo (USP) oferecida para alunos de Graduação em Odontologia sob a coordenação da Profa. Rita de Cássia Café Ferreira.

- 2009-2013

4.3.2 Disciplina BMM0160 Microbiologia Básica do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo (USP) oferecida para alunos de Graduação em Farmácia sob a coordenação do Prof. Luis Carlos de Souza Ferreira.

- 2010-2011

4.3.3 Disciplina BMM0280 Microbiologia Básica do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo (USP) oferecida para alunos de Graduação em Medicina sob a coordenação do Prof. Luis Carlos de Souza Ferreira.

- 1º Semestre 2009

4.3.4. Disciplina de Tecnologia de fermentações oferecida pela Faculdade de Medicina do ABC - São Paulo. Disciplina oferecida a alunos do curso de Farmácia sob a coordenação do Prof. Hugo Alencar Izabel.

- 1º Semestre 2010

5- Monografia de graduação ou pós-graduação *lato senso* orientada e aprovada

Relato do ensino de genética em duas escolas de Governador Valadares

Especialista: Elaine Carlos Sherer

Instituição: Instituto de pós graduação Médica do Rio de Janeiro

Orientador: Rafael Ciro Marques Cavalcante

Ano de obtenção: 2010

Mecanismo de resistência aos antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*

Especialista: Juliana Mauri Furlaneto

Instituição: Instituto de pós graduação Médica do Rio de Janeiro

Ano de Obtenção: 2009

6- Participação em bancas de trabalhos de especialização *latu senso*

CAVALCANTE, R. C. M.; GOMES, P. A. D. P.; Garrido, L.M.. Participação em banca de Nádia Carolina de Andrade. **Obtenção e detecção de plantas transgênicas. 2010.** Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Pós-Graduação Médica do Rio de Janeiro.

CAVALCANTE, RAFAEL C. M.; Garrido, L.M.; Nepomuceno, R. S. L. Participação em banca de Elaine Carlos Scherrer. **Relato de ensino de genética em duas escolas de Governador Valadares-MG. 2010.** Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Pós-Graduação Médica do Rio de Janeiro.

GOMES, P. A. D. P.; Nepomuceno, R. S. L; **CAVALCANTE, R. C. M..** Participação em banca de Gerdil Leal de Azeredo. **A influência dos polimorfismos genéticos na expressão de proteína C reativa. 2009.** Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Pós-Graduação Médica do Rio de Janeiro.

CAVALCANTE, R. C. M; Garrido, L.M.; GOMES, P. A. D. P.. Participação em banca de Camili Cunha Chamone. **Estudo genealógico da luxação de patela em cães da raça buldogue francês. 2009.** Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Pós-Graduação Médica do Rio de Janeiro.

Cavalcante, R. C. M.; GOMES, P. A. D. P.; Nepomuceno, R. S. L. Participação em banca de Juliana Mauri Furlaneto. **Mecanismos de resistência aos antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. 2009.** Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Pós-Graduação Médica do Rio de Janeiro.

Garrido, L.M.; **CAVALCANTE, R. C. M.**; GOMES, P. A. D. P.. Participação em banca de Rosilene dos Santos Severino. **Uso da terapia Gênica para o estudo da imunodeficiência combinada. 2009.** Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Pós-Graduação Médica do Rio de Janeiro.

GOMES, P. A. D. P.; **Cavalcante, R. C. M.**; Nepomuceno, R. S. L. Participação em banca de Laura Cristina Duarte. **Hemofilia A: uma revisão bibliográfica. 2009.** Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Pós-Graduação Médica do Rio de Janeiro.

7- Palestras e cursos ministrados

Bacillus subtilis spores as a platform to express and purify recombinant heterologous proteins. 2012.

Evento: European Spore Conference

Local: Royal Holloway University Londres, Reino Unido;

Novas Tecnologias em Vacinas Recombinantes

Evento: Curso de Vacinas

Local: Universidade de São Paulo / Universidade Federal de São Paulo

Purificação de proteínas por cromatografia. 2010

Evento: II Curso de Férias em Ciências Genômicas e Biotecnologia

Local: Universidade Federal do Ceará - Fortaleza Ceará

Emprego de Bactérias geneticamente modificadas como veículos vacinais vivos. 2011.

Evento: III Curso de Férias em Ciências Genômicas e Biotecnologia

Local: Universidade Federal do Ceará - Fortaleza Ceará

8- Estágios

Harvard Medical School

Período: maio a julho de 2009

Escopo: T-cell antigen delivery Techniques

Orientador : Darren Higgins

Harvard Medical School

Período: junho a dezembro de 2012

Escopo: Evaluating *Bacillus subtilis* and *Listeria innocua* as vaccine delivery vectors

Orientador : Darren Higgins

9- Outras informações relevantes

Acessoria científica 2008

Desenvolvimento de tecnologias em descontaminação de camas de frango.

Empresa: Ouro Fino Saúde Animal

Local: Ribeirão preto- SP

Aprovação em Concurso público de provas e títulos

Professor Efetivo

Univesdidade Federal de Sergipe

Curso: Farmácia

10 de outubro de 2013.