UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**INSERÇÃO DE EPITOPO HETERÓLOGO EM DIFERENTES REGIÕES
DE FLAGELINA BACTERIANA: INFLUÊNCIA NA FUNÇÃO FLAGELAR
E IMUNOGENICIDADE**

FÁTIMA DA PIEDADE DE MELO AZEVEDO

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA: PROFa. Dra. SALETE M. C. NEWTON

SÃO PAULO

1997

“Inserção de Epitopo Heterólogo em Diferentes Regiões de Flagelina Bacteriana: Influência na Função Flagelar e Imunogenicidade”

FÁTIMA DA PIEDADE DE MELO AZEVEDO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. MARIA JULIA MANSO ALVES
IQ - USP
(Presidente)

Profa. Dra. BEATRIZ AMARAL DE CASTILHO
UNIFESP

Profa. Dra. LUISA LINA VILLA
ILPC

Prof. Dr. HELIO KIYOSHI TAKAHASHI
UNIFESP

Profa. Dra. CLARISA BEATRIZ PALATNIK DE SOUSA
UFRJ

SÃO PAULO
22 DE MAIO DE 1997

Aos meus pais,

que não pouparam esforços para que eu
tivesse tudo o que eles não tiveram.

A José Maria (Zélio),

meu companheiro de todos os momentos, e
a Laura,

os dois maiores amores da minha vida.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que colaboraram na elaboração deste trabalho. Em particular, meus sinceros agradecimentos:

À Prof^a. Dra. Salete Newton, minha orientadora, cujo apoio, incentivo, paciência e carinho contribuíram de forma significativa para o desenvolvimento desse trabalho.

À Prof^a. Dra. Maria Helena Juliani, com quem comecei a aprender boa parte do que sei hoje e que, infelizmente, não se encontra mais entre nós.

Aos professores do laboratório de genética, Ana Clara Schenberg, Juarez Braz de Faria, Gabriel Padilla, Elisabete Vicente, Beatriz L. Fernandes e Sérgio Olavo P. Costa, pela atenção, conselhos e conversas informais.

Às professoras do Instituto de Química, Dra. Suely Lopes Gomes e Dra. Aline Maria Silva, pela atenção e carinho, durante a época de iniciação científica e início do mestrado.

Às companheiras de bancada, Elizabete Sbrogio, Léa Barco e Inês Chen, que tanto me ajudaram com discussões, brincadeiras, camundongos e outras “coisinhas mais”. Também a Júlia, hoje em outro país, mas sempre presente no meu coração, pela participação no início do trabalho, por sua amizade e atenção. Ao Waltênio (Beckers), pela colaboração em diversos momentos do trabalho e que, infelizmente, deixou a vida tão cedo.

Aos colegas do “Lab.”, Ciça (Sucupira), Ileana, Maria, André, Balan, Andreinha, Solange, Míriam, Renata, Cátia, Elza, Beatriz, Daniel, Vanda, Adriano, Cleofe, Mozart, João Renato, Gabriela, Renata Mancini, Quitéria, Nádia, Marcelo e Wendell, principalmente, pelas horas de descontração e papos no “café”, além das discussões de cunho científico.

Ao pessoal da parte técnica, Kazue, Leninha, Norma, Sr. Antônio, Sr. Hisao e Carlos (do biotério) que, sempre prestativos, me ajudaram a tocar esse trabalho.

Aos amigos da Química (Bloco 12), especialmente à Rosângela, pela ajuda com a purificação da proteína e pela amizade, e a Marilis, Rosane, Júlio, Gláucia, Patrícia, Ana Cláudia e Marcelo que, pela companhia, tornavam o trabalho ainda mais agradável.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Ferreira, pela atenção e sugestões aplicadas a parte final desse trabalho.

Às pesquisadoras Sylvia Mendes Carneiro, do Instituto Butantan, pela colaboração com a parte de microscopia eletrônica, e à Aparecida Tiemi Nagao, do Departamento de Imunologia, pelas “dicas” e sugestões nos ELISAs.

Às “meninas” da seção de alunos de pós-graduação da Bioquímica, principalmente à Cibele e Vilma, pela atenção durante o período em que estive vinculada ao Departamento.

Às agências financiadoras FAPESP e CAPES, pela concessão de bolsas de mestrado e doutorado, durante o período do trabalho.

Na esperança de não ter esquecido ninguém, renovo meus agradecimentos a todos os amigos, finalizando com um agradecimento muito especial ao meu querido companheiro (Zé) que, como ele mesmo se referiu numa certa dissertação, com muito carinho e compreensão me incentivou e aturou durante esses longos anos de doutorado.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
 1- INTRODUÇÃO.....	 01
1.1- VACINAS- ASPECTOS GERAIS.....	01
1.2- VACINAS CONTRA FEBRE TIFÓIDE.....	06
1.3- LINHAGENS ATENUADAS GENETICAMENTE.....	09
1.4- UTILIZAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>SALMONELLA</i> EXPRESSANDO ANTÍGENOS HETERÓLOGOS.....	11
1.5- USO DO FLAGELO DE <i>SALMONELLA</i> COMO CARREGADOR DE EPITOPOS HETERÓLOGOS.....	14
2- OBJETIVOS.....	21
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1- LINHAGENS BACTERIANAS.....	22
3.1.1- Linhagens de <i>E. coli</i>	22
3.1.2- Linhagens de <i>Salmonella</i>	23
3.2- PLASMÍDIOS BÁSICOS.....	24
3.2.1- pLS408.....	24
3.2.2- pLS503.....	24
3.3- PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, OLIGONUCLEOTÍDEOS E ANTICORPOS.....	25

3.4- MEIOS DE CULTURA.....	26
3.5- TAMPÕES, SOLUÇÕES E OUTROS REAGENTES.....	28
3.5.1- Soluções para mini-preparação de DNA plasmidiano.....	28
3.5.2- Soluções para eletroforese de DNA.....	29
3.5.3- Tampões para enzimas não restrição.....	29
3.5.4- Soluções para sequenciamento de DNA.....	30
3.5.5- Soluções para preparação de proteína purificada.....	31
3.5.6- Soluções para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE).....	32
3.5.6.1- Soluções para coloração do gel.....	33
3.5.7- Soluções para “western-blot”	33
3.5.8- Soluções para os ensaios imunoenzimáticos.....	34
3.6- EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIANO.....	35
3.6.1- Preparação em média escala de DNA de plasmídio.....	35
3.6.2- Mini-preparações de DNA plasmidiano.....	36
3.7- TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS.....	37
3.8- ANÁLISE DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	38
3.9- REAÇÕES COM ENZIMAS DE MODIFICAÇÃO.....	39
3.9.1- Preenchimento de extremidades protuberantes do DNA.....	39
3.9.2- Ligação de fragmentos de DNA.....	39
3.9.3- Fosforilação de adaptadores.....	40
3.10- ELUIÇÃO DO DNA DA AGAROSE.....	40
3.11- PREPARAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	41
3.12- PREPARAÇÃO DE FLAGELINA PURIFICADA.....	41
3.13- GEL DE POLIACRILAMIDA PARA PROTEÍNA.....	42
3.13.1- Coloração para proteínas.....	42
3.14- “WESTERN-BLOT”	43
3.14.1- Transferência de proteínas para filtro de nitrocelulose e tratamento do filtro.....	43

3.15- SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	45
3.15.1- Preparação do DNA molde (dupla fita).....	45
3.15.1.1- Lise alcalina com Rnase após a solução P1.....	45
3.15.1.2- Preparação de DNA por QUIAGEN.....	45
3.15.2- Desnaturação do DNA.....	46
3.15.3- Anelamento do “primer”	46
3.15.4- Reações de sequenciamento.....	47
3.15.5- Eletroforese da reação de sequenciamento.....	47
3.16- IMOBILIZAÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> COM ANTICORPO.....	48
3.17- ESTUDOS IMUNOLÓGICOS.....	49
3.17.1- Animais utilizados e preparação dos soros.....	49
3.17.2- Preparação dos antígenos utilizados nas imunizações.....	49
3.17.2.1- Preparação das linhagens usadas como vacinas- vivas.....	49
3.17.2.2- Preparação das linhagens inativadas por calor.....	50
3.17.2.3- Preparação da proteína purificada.....	50
3.17.3- Imunizações: doses e esquemas.....	51
3.17.3.1- Imunizações com bactérias viva-via intraperitoneal.....	51
3.17.3.2- Imunização com bactéria inativada por calor- via intraperitoneal.....	51
3.17.3.3- Imunizações com proteína purificada.....	51
3.17.4- Teste de persistência das linhagens de <i>Salmonella</i> nos camundongos.....	52
3.17.5- Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos	53
3.17.5.1- Ensaio imoenzimático para detecção de anticorpos contra a flagelina.....	53

3.17.5.2- Ensaio imonenzimático para detecção de anticorpos contra o peptídeo SM5.....	54
3.17.5.3- Ensaio imonenzimático contra bactéria total.....	55
3.18- MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	56
4- RESULTADOS.....	57
4.1- INSERÇÃO DA SEQUÊNCIA DO EPITOPO HETERÓLOGO NO GENE DA FLAGELINA.....	57
4.1.1- Inserção na região III.....	57
4.1.2- Inserção na região VI.....	58
4.1.3- Inserção na região VIII.....	59
4.1.4- Inserção de dois epitopos na flagelina.....	60
4.1.4.1- Inserção na região IV e VI.....	60
4.1.4.2- Inserção na região III e IV.....	61
4.1.5- Transferência dos plasmídios para <i>Salmonella</i>	61
4.2- EXPRESSÃO DA FLAGELINA RECOMBINANTE NAS DIFERENTES LINHAGENS DE <i>SALMONELLA</i>	62
4.2.1- Testes de motilidade.....	63
4.2.2- Bloqueio da motilidade com anticorpos.....	64
4.2.3- Detecção de proteína recombinante por “western-blot”.....	65
4.2.4- Detecção de flagelina em bactérias inteiras através de ELISA.....	67
4.2.5- Microscopia eletrônica.....	69
4.3- ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE.....	69
4.3.1- Verificação da persistência bacteriana.....	69
4.3.2- Propriedades imunogênicas- resposta humoral.....	70
4.3.2.1- Imunizações com bactérias vivas e inativadas.....	71
4.3.2.2- Imunização com flagelina híbrida purificada.....	74
4.3.2.3- Imunização com bactéria viva-estudo das linhagens com dois epitopos.....	77

5- DISCUSSÃO.....	104
5.1- EFEITOS DAS INSERÇÕES NA FUNÇÃO FLAGELAR.....	111
5.2- IMUNOGENICIDADE DAS CONSTRUÇÕES.....	115
5.3- PERSPECTIVAS FUTURAS COM O SISTEMA FLAGELAR.....	124
6- BIBLIOGRAFIA.....	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Via biossintetica dos compostos aromáticos	78
Figura 2: Representção esquemática do gene <i>fliC</i>	79
Figura 3: Plasmídio pLS408	80
Figura 4: Plasmídio pLS503	81
Figura 5: Seqüência do epitopo da SM5(1-15).....	82
Figura 6: Seqüência do adaptador XSC e “primers para seqüenciamento.....	83
Figura 7: Estratégia de clonagem na região III.....	84
Figura 8: Seqüência do gene <i>fliC</i> após inserção do adptador nas regiões III e VI.....	85
Figura 9: Análise de restrição dos recombinates e seqüência do clone com inserto na região III.....	86
Figura 10: Estratégia de clonagem da região VI.....	87
Figura 11: Análise de restrição dos recombinates e seqüência do clone com inserto na região VI.....	88
Figura 12: Análise de restrição dos recombinates da região VIII	89
Figura 13: Análise de restrição dos recombinates com dupla inserção- região IV e VI.....	90
Figura 14: Análise de restrição dos recombinates com dupla inserção- região IV e III.....	91
Figura 15: Verificação da expressão das proteínas híbridas	92
Figura 16: Imunoensaio com bactéria total.....	93
Figura 17: Microscopia eletrônica- Linhagens SL5928 e ICB5.....	94
Figura 18: Microscopia eletrônica- Linhagens SL5930 e SL7127.....	95
Figura 19: Microscopia eletrônica- Linhagens ICB9 e ICB11.....	96

Figura 20: Microscopia eletrônica- Linhagens ICB7 e ICB8.....	97
Figura 21: Microscopia eletrônica- Linhagens ICB10 e ICB12.....	98
Figura 22: Resultados de persistência bacteriana- baço e fígado	99
Figura 23: Gráficos com títulos de anticorpos de animais imunizados com bactérias vivas.....	100
Figura 24: Gráficos com títulos de anticorpos de animais imunizados com bactérias inativadas.....	101
Figura 25: Resposta humoral de animais imunizados com bactérias vivas e inativadas.....	102
Figura 26: Gráficos com títulos de anticorpos de animais imunizados com flagelina purificada.....	103

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens e plasmídios.....	62
Tabela 2: Teste de motilidade e bloqueio com anticorpos.....	65
Tabela 3: Resposta humoral contra bactéria viva e inativada.....	73
Tabela 4: Resposta humoral contra flagelina purificada	76
Tabela 5: Teste das linhagens com duas inserções.....	77

ABREVIATURAS

AMPc= adenilato cíclico

APC= célula apresentadora de antígeno

APS= persulfato de amônio

ATP= adenosina trifosfato

BCG= Bacilo de Calmette-Guérin

bp= pares de base

Bisacrilamida= N -N'-metileno-bis-acrilamida

BSA= albumina de soro bovina

CAP= proteína ativadora do catabolismo

CS= proteína de circunsporozoito

CTB= subunidade β da toxina colérica (Cholerae toxin β subunit)

DAB= 3,3'-diaminobenzidina

DHB= ácido 2,3 di-hidroxibenzóico

DNA= ácido desoxirribonucleico

dATP= desoxi-adenosina-5'-trifosfato

dCTP= desoxi-citidina-5'-trifosfato

dGTP= desoxi-guanosina-5'-trifosfato

dNTPs= desoxinucleosídeos 5'-trifosfato

DO= densidade óptica

DTT= ditionitrito

dTTP= desoxi-timidina-5'-trifosfato

EDTA= ácido etileno diamino tetracético

ELISA= teste imunoenzimático (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay)

GALT= tecido linfóide associado ao intestino (gut-associated lymphoid tissue)

HBsAg= antígeno da superfície do vírus da hepatite B

HEL= lisozima (hen egg white lysozyme)

HIV= vírus da imunodeficiência humana

Kpb= 1.000 pares de bases

KDa= Kilodalton

LB= meio de Luria-Bertani, para cultivo de bactérias (composição item 3.4)

LPS= lipolissacarídeo

MCS= múltiplo sítio de clonagem

MHC= complexo principal de histocompatibilidade

MM= materiais e métodos

OPD= orto-fenileno diamina

PABA= ácido para-aminobenzóico

PBS= solução salina tamponada de fosfato

PEG= polietilenoglicol

RNase= ribonuclease

SDS= duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE= gel de poliacrilamida-SDS

sIgA= imunoglobulina A secretória

SOC= meio para cultivo de bactérias (composição item 3.4)

TBE (1x)= tampão Tris-borato-EDTA

TE= tampão Tris-EDTA

TEMED= N, N, N, N'-tetrametiletilenodiamina

Tris= Trishidroximetilaminometano ou 2-amino-2-hidroxi-metil-1, 3-propanediol

YT= meio para cultivo de bactérias (item 3.4)

RESUMO

Uma das estratégias mais promissoras para a biotecnologia de vacinas é o desenvolvimento de linhagens precisamente atenuadas, e que possam ser usadas como carregadoras de antígenos heterólogos. Mutantes de *Salmonella* Typhimurium têm sido extensivamente utilizados com essa finalidade.

A flagelina, monômero constituinte do filamento flagelar, vem sendo empregada como carregadora de antígenos heterólogos, inseridos na região central, hipervariável (região IV). Inserções nessa região são freqüentemente funcionais, e levam à exposição do epitopo na superfície do filamento. O presente trabalho explora o potencial de outras regiões da molécula para a inserção de epitopos. Nós inserimos a mesma seqüência usada anteriormente (epitopo da proteína M de *S. pyogenes*, Tipo 5) em regiões com diferentes níveis de homologia (III e VI), e em região totalmente conservada (VIII). Também foram feitas inserções duplas em regiões que se mostraram toleráveis (III e IV; IV e VI). Todas as proteínas híbridas foram sintetizadas pela *Salmonella*, como demonstrado em imunoblots, usando anticorpo contra a flagelina e contra o peptídeo. Todas as regiões, exceto a VIII, aceitaram a inserção sem perda de motilidade, apesar de, em alguns casos, ela ter sido extremamente reduzida. A imunogenicidade foi avaliada pela imunização de camundongos com bactérias vivas, inativadas ou, quando possível, flagelina purificada. Os resultados foram similares aos descritos na literatura para inserções envolvendo a região IV, obtendo-se um elevado título de anticorpos contra flagelina. Um baixo nível de anticorpo contra o peptídeo também foi detectado para todas as novas linhagens testadas. Nossos resultados com imunização de bactérias vivas sugerem uma resposta levemente melhor ao peptídeo quando duas cópias estão presentes, mas os dados não são conclusivos.

SUMMARY

One of the most promising strategies for the biotechnology of vaccines is the development of precisely attenuated strains, which could be used as carriers of heterologous antigens. Mutants of *Salmonella* Typhimurium have been extensively explored to this effect, since the infection of mice by *S. Typhimurium* mimics the infection of humans by *S. Typhi*, and the genetics of the species is extremely well known, making it easy the obtention of defined mutants with reduced pathogenicity. Mutants with auxotrophy in genes of the aromatic pathway are particularly attractive, since they need PABA and DHB to grow, and these compounds are unavailable in mammalian tissues.

Flagellin, the monomer which constitutes the flagellar filament, has been used as a carrier for heterologous epitopes, inserted in a central, hypervariable region (region IV). Insertions in this region are often functional, and lead to exposition of the epitope at the filament's surface. The present work explored the potential of the other regions of the molecule for the insertion of epitopes. We inserted the same reporter sequence (M5 epitope from *S. pyogenes* M protein) in regions with different levels of homology (III and VI), and totally conserved (VIII). We also made double insertions in regions shown to be permissive (III and IV; IV and VI). All hybrid proteins were synthesized by *Salmonella*, as demonstrated by immunoblots using antibody against flagellin and against the synthetic peptide. All regions, except the highly conserved region VIII, accepted the insertions without loss of motility, albeit, in some cases, motility was seriously reduced. Immunogenicity of the hydrids was evaluated by immunization with live bacteria, killed bacteria, and purified flagellin (when possible). Results obtained with the new constructs were similar to the ones published for insertions involving region IV, in the sense that antibody titers to the carrier protein were very high. A low level of antibody to the inserted peptide was also detected in all groups of animals. Our results with live immunization suggest a slightly better response to the peptide when two copies are present, but the data are not conclusive.

1- INTRODUÇÃO

1.1- VACINAS- ASPECTOS GERAIS

A vacinação é o meio mais eficiente para prevenção de uma ampla variedade de doenças infecciosas. Diversos programas de vacinação resultaram na erradicação da varíola e, recentemente, da poliomielite (nas Américas); a dramática redução do sarampo, difteria, tétano e coqueluche, no mundo inteiro, é reflexo direto da utilização de vacinas contra essas doenças. Com poucas exceções, a maioria das vacinas é administrada como parte de um programa rotineiro de imunização infantil. O maior problema encontrado por esses esquemas de imunização primária é a necessidade de múltiplas doses de vacinas, além de repetidos reforços periódicos.

O princípio que norteia a vacinação é relativamente simples: induzir em um indivíduo um estado de sensibilização tal que, havendo contato com o microrganismo patogênico, uma rápida e efetiva resposta imune secundária seja desenvolvida, levando à prevenção da doença. Um bom resultado depende da habilidade dos linfócitos, tanto células B quanto T, responderem a antígenos específicos e se desenvolverem em células de memória. Dessa maneira, representam uma forma de imunidade adaptativa ativamente ampliada (Mims *et al.*, 1993). Em contraposição, encontra-se a imunidade passivamente adquirida, onde proteção temporária contra uma infecção é estabelecida pelo fornecimento de anticorpos pré-formados de outro indivíduo da mesma espécie ou de espécies diferentes. Essa proteção é gradualmente perdida, uma vez que os anticorpos adquiridos são utilizados por ligação ao antígeno e/ou catabolizados pelo organismo (Roitt, 1994).

Uma propriedade importante das vacinas é estimular uma forte resposta imune, estabelecendo um nível de anticorpos adequado e sensibilização de uma população de células de memória que possam responder rapidamente a um contato posterior com o antígeno e, dessa forma, gerar proteção contra a infecção. Nem todos

os tipos de moléculas são igualmente efetivos nessa função: polissacarídeos, por exemplo, são geralmente muito menos imunogênicos do que proteínas e geram somente uma imunidade de curta duração, além de não produzirem resposta ativando células T. Algumas vezes, como no caso da poliomielite, é necessário um alto título de anticorpos no sangue. Ao contrário, em doenças causadas por micobactéria como tuberculose, a imunidade mediada por células é a mais efetiva. O local da resposta imune desenvolvida pela vacinação também é muito importante. Por exemplo, em cólera, os anticorpos precisam estar na luz do intestino (ou na mucosa intestinal) para inibir a aderência e colonização da parede intestinal; anticorpos no sangue serão de pouca utilidade, a menos que os organismos sejam invasivos (Salyers & Whitt, 1994).

Outros fatores importantes que devem ser considerados para produção de uma vacina são: custo de produção, estabilidade das preparações e a segurança. Vacinas constituem uma contribuição importantíssima para programas de saúde pública, e somente poderão ser estendidas a milhões de pessoas se o custo não for elevado, principalmente em países subdesenvolvidos. Em geral, uma vacina constituída por um componente bacteriano purificado ou uma vacina obtida por combinação de vários componentes é mais cara do que uma vacina preparada a partir de uma bactéria intacta, devido aos custos adicionais da purificação e processamento dos componentes bacterianos. Do ponto de vista de custo e segurança, uma vacina oral teria vantagem sobre uma vacina injetável, devido aos problemas e despesas associados à aplicação dessa última. Além disso, também seria a forma mais indicada para obter proteção contra diferentes patógenos entéricos. Somente algumas vacinas como poliomielite, cólera e febre tifóide são licenciadas para administração oral; todas consistindo de linhagens vivas atenuadas, mimetizando a infecção natural (European Comission COST/STD, 1996). Quanto à estabilidade, o ideal seria obter uma vacina estável mesmo sob condições climáticas extremas, preferencialmente sem refrigeração (Salyers & Whitt, 1994). O uso de bactérias geneticamente modificadas e imunização por DNA são duas ferramentas que poderiam ser empregadas para obtenção de componentes para vacinas de forma mais acessível e com menor custo.

Atualmente, a segurança é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de vacinas, principalmente na busca de vacinas atenuadas (Roitt, 1994). Em geral, a probabilidade de vacinas complexas consistindo de bactérias inteiras mortas causarem efeitos adversos é maior do que as produzidas a partir de componentes definidos. A razão disso é que a presença de grande quantidade de LPS e outros componentes da parede celular bacteriana pode gerar efeitos nocivos. Para vacinas vivas, o ponto mais importante é a garantia da não reversão ao fenótipo virulento após a imunização e, também, que pessoas com o sistema imune comprometido não venham a adquirir infecção após a imunização, como já foi descrito no caso da utilização da BCG em pacientes aidéticos ou outro tipo de problema imunológico (Salyers & Whitt, 1994).

O requerimento mínimo de uma vacina é que ela deva conter alguns (ou no mínimo um) antígenos protetores do microrganismo em questão. As vacinas atuais consistem de microrganismos mortos, de fragmentos subcelulares ou ainda organismos cuja virulência foi artificialmente reduzida, cada tipo apresentando vantagens e desvantagens. Além desses três, outras novas estratégias vêm sendo desenvolvidas na área, visando uma melhora da resposta imune. Entre elas, destacam-se o uso de lipossomos e imunização com DNA.

Os lipossomos são pequenas vesículas lipídicas utilizadas como agentes para a apresentação de antígenos ao sistema imune. Embora a forma exata de atuação de lipossomos na indução de resposta imune seja desconhecida, é possível que ele atue como um vacúolo de estoque de antígenos dentro do macrófago ou, talvez, por união à membrana do macrófago, formando um complexo imunogênico. Com essa tecnologia, é possível criar vacinas com múltiplos antígenos, diferentes adjuvantes, e voltadas para moléculas alvo específicas. Esses veículos, obtidos por diferentes formulações, podem fornecer lenta liberação do antígeno (ou qualquer droga ou hormônio) por períodos de até vários meses (Roitt, 1994).

A descoberta recente de que a inoculação direta de DNA purificado em células musculares não só leva à produção da proteína codificada por esse DNA, mas também à geração de uma resposta imune contra ela, abriu uma nova linha de pesquisa

no campo de vacinas. Resultados surpreendentes vêm sendo obtidos com DNA introduzido mecanicamente, por injeção para células musculares ou derme, não somente se obtendo expressão, mas também longa persistência, sendo que esse parâmetro poderá se mostrar como um problema para a regulamentação e aprovação de produtos. Alguns trabalhos com DNA introduzido em mucosas (nasal, retal) têm sido descritos, mas estudos profundos devem ser realizados, visando sistemas que empreguem o DNA (European Comission COST/STD, 1996).

Vacinas com organismos mortos ou inativados são usadas quando não existem organismos atenuados disponíveis, isto é, onde atenuação estável da linhagem não foi obtida ou ocorre fácil reversão para o fenótipo virulento. Elas têm a vantagem de não infectar, portanto são relativamente seguras, mas geralmente apresentam imunogenicidade mais baixa e, conseqüentemente, necessidade de várias doses. A inativação pode ser feita por vários processos. Na vacina mais antiga contra poliomielite (Salk), os vírus são inativados com formaldeído. Já para inativação de bactérias, o mais usado é formaldeído, fenol, acetona ou, simplesmente, calor. Alguns exemplos de vacina usando esses métodos são: febre tifóide (*Salmonella* Typhi inativada por aquecimento e preservada por fenol ou acetona), *Vibrio cholerae* inativado por calor, *Yersinia pestis*, por formaldeído. Um cuidado especial deve ser tomado para evitar que antígenos protetores sejam destruídos durante o processo de inativação.

Vacinas com frações subcelulares são produzidas quando a imunidade protetora pode ser obtida através de inoculação com um componente do microrganismo. A utilização de um componente como vacina pode evitar problemas de supressão de resposta a antígenos protetores ou hipersensibilidade, muito comum quando se utiliza um parasita ou bactéria completa para imunização. Alguns exemplos de componentes celulares utilizados em preparações vacinais são: cápsulas de polissacarídeos de pneumococos, hemófilos, meningococos e antígenos de superfície do vírus de hepatite B. Exotoxinas bacterianas, como as produzidas por difteria e pelo bacilo do tétano, são usadas como imunógenos após serem tratadas com formaldeído, sem permitir a destruição dos determinantes antigênicos. O toxóide, assim gerado, é

geralmente administrado depois da adsorção a hidróxido de alumínio, que age como adjuvante, aumentando a produção de anticorpos.

Atualmente, com a tecnologia do DNA recombinante, é possível clonar parte de um gene que codifica uma proteína, ou mesmo a proteína inteira, e expressá-lo em um vetor apropriado. O potencial da clonagem gênica é obviamente vasto e, em princípio, econômico, mas existem dificuldades na identificação de um bom vetor de expressão, na obtenção da estrutura correta da cadeia polipeptídica, para produzir uma proteína ativa, e na separação do produto requerido da cultura em um estado não denaturado. Antígenos também podem ser representados por pequenos peptídeos de sequência correspondente a importantes epitopos de diferentes microrganismos, existindo extensa pesquisa na questão de como selecionar o peptídeo correto e torná-lo o mais imunogênico possível.

As vacinas atenuadas geralmente são mais efetivas que as inativadas. O objetivo da atenuação é produzir um organismo modificado que mimetize o comportamento natural do microrganismo, sem causar a doença. Em muitos exemplos, a imunidade conferida por vacinas mortas, mesmo quando administradas com adjuvantes, é freqüentemente inferior à resposta resultante de infecções com organismos vivos atenuados. Isto deve ser devido, em parte, à replicação dos organismos vivos nos tecidos do hospedeiro, oferecendo ao sistema imune maior quantidade de antígeno e por mais tempo. Outra vantagem significativa é que a resposta imune ocorre no sítio da infecção natural (Roitt, 1994).

Esses organismos atenuados podem ser obtidos através da simples identificação de linhagens heterólogas que são virulentas para outras espécies, mas avirulenta no homem, como foi o caso do vírus da varíola usado como vacina, que era originário de vacas, ou podem ser obtidos por outros meios. Uma outra forma é modificar as condições de crescimento dos organismos e, como exemplo disso, pode-se citar a obtenção de uma linhagem de *Mycobacterium tuberculosis* que se tornou atenuada por inúmeras passagens em meio de cultura. Calmette e Guérin (1908), no Instituto Pasteur, adicionaram bile ao meio de cultura numa tentativa de obter um crescimento mais disperso dos organismos. Depois de 13 anos de cultura nesse tipo de

meio, a linhagem permaneceu atenuada. Esse organismo, BCG (Bacilo Calmette-Guérin), tem sido empregado largamente na imunização até os dias de hoje. Outro exemplo é o da atenuação do vírus influenza e outros vírus do trato respiratório por adaptação ao frio. Os organismos podem crescer a baixas temperaturas (32-34°C) no trato respiratório superior, mas falham em produzir os sintomas da doença devido à sua inabilidade de replicar no trato respiratório inferior (37°C).

Com o desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante, é possível induzir, deliberadamente, mudanças genéticas de forma conhecida e definida, que podem ser utilizadas tanto para vírus, bactérias e parasitas. A maioria é mutante por deleção, afetando genes de virulência. Como exemplos experimentais, pode-se citar a linhagem de poliovírus tipo 2, com uma única mudança de base, vírus causadores da raiva sem a via completa da timidina kinase, organismos de *V. cholera* sem o gene para a subunidade A da toxina, linhagens de *Salmonella* com mutações *aro* ou *galE* (European Commission COST/STD, 1996).

1.2- VACINAS CONTRA FEBRE TIFÓIDE

Tem sido extremamente difícil desenvolver uma vacina aceitável e efetiva contra doenças causadoras de diarreia, mesmo empregando-se a apresentação de antígenos à mucosa, uma forma com alto potencial para produção de uma vacina eficiente. Cólera, disenteria e salmonela (particularmente a tifóide) têm sido alvo de inúmeros estudos visando o desenvolvimento de vacinas (Dougan, 1994).

Infecções por *Salmonella* permanecem como um sério problema de saúde mundial. Estes patógenos, formados por um grupo com espécies muito próximas e diversos sorotipos, são capazes de causar uma série de doenças em mamíferos, variando de gastroenterite a infecções disseminadas, envolvendo órgãos do sistema fagocítico mononuclear, a saber: baço, fígado, linfonodos e medula. No homem, *Salmonella Typhi*, o agente causador da febre tifóide, é o exemplo mais dramático de

uma salmonela invasiva, apesar de outras linhagens poderem igualmente causar infecções sistêmicas (Chatfield, 1989).

A febre tifóide é uma infecção aguda, generalizada, do sistema reticuloendotelial, tecido linfóide intestinal e vesícula, causada pela *Salmonella* Typhi. A doença pode ser caracterizada por febre alta persistente, desconforto abdominal, mal-estar e dor de cabeça. *Salmonella* Enteritidis, sorotipos A e B, também causam febre entérica (febre paratifóide), a qual, em muitos casos, é clinicamente indistinguível de febre tifóide. Em geral, nas regiões onde a febre entérica é endêmica, a febre tifóide corresponde a aproximadamente 90% dos casos, enquanto a paratifóide constitui o restante (Levine *et al.*, 1989).

As primeiras vacinas empregadas contra a febre tifóide (final do século XIX) foram produzidas a partir de *S. Typhi* inativada (por calor ou fenol) e utilizadas como vacinas parenterais, produzindo severas reações adversas, locais e generalizadas. Vacinas produzidas a partir de células inteiras mortas, inativadas por acetona ou formalina, administradas por via oral, foram amplamente estudadas nos anos 60 e 70, resultando em vacinas com baixa eficiência e curto período de proteção. A via de imunização preferida voltou a ser a parenteral, devido à melhora da resposta, mesmo empregando-se as células inativadas. Esta vacina mostrou eficiência razoável, mas variável, e respostas inflamatórias diversas em uma fração significativa da população vacinada. Esse fator foi melhorado pelo desenvolvimento de uma vacina parenteral baseada no antígeno Vi purificado, que é uma cápsula de polissacarídeo que confere maior virulência às linhagens (Levine *et al.*, 1989).

Uma outra linha de pesquisa utilizou linhagens vivas como vacinas orais. Uma das primeiras linhagens utilizadas foi uma *S. Typhi* dependente de estreptomicina que tinha crescimento seriamente restrito na ausência do antibiótico, mas possuía outras atenuações, já que a linhagem era inócua mesmo quando administrada oralmente com estreptomicina, permitindo a proliferação dos organismos (Levine *et al.*, 1989). Um ponto limitante no desenvolvimento das vacinas era a falta de um mecanismo de atenuação definido para as linhagens de *S. Typhi* e de um modelo de estudo que permitisse a observação do comportamento de tais linhagens, já que *S.*

Typhi somente é infecciosa para humanos (Germanier & Fürer, 1975). A utilização de camundongos com linhagens de *S. Typhimurium* e outros sorotipos permitiu o estudo de forma mais abrangente, uma vez que essas linhagens produzem uma infecção análoga aos eventos associados com a inoculação de humanos com uma linhagem virulenta.

A partir de observações com o modelo em camundongos, Germanier e Fürer (1971) notaram que mutantes de *S. Typhimurium* defectivos na biossíntese de lipopolissacarídeos eram atenuados. Após estudos cuidadosos, ele mostrou que esses mutantes eram defectivos na enzima UDP-galactose epimerase (mutantes *galE*) e não eram somente atenuados, como altamente imunogênicos. A partir dessas informações, tentou desenvolver uma linhagem *galE* de *S. Typhi* para utilização em humanos. A linhagem TY21a foi selecionada a partir de mutações com nitrosoguanidina, e é um mutante defectivo na enzima UDP-galactose-4-epimerase, com uma redução de cerca de 80% na atividade de outras duas enzimas da via Leloir, todas utilizadas na síntese do antígeno O do LPS tipo liso. Quando crescida na ausência de galactose, Ty21a não possui o antígeno O do LPS e, nesse estado, é pouco imunogênica. Por outro lado, quando crescida na presença de galactose exógena, o antígeno O é produzido. Entretanto, devido à falta da epimerase, a linhagem Ty21a, de forma similar a outros mutantes *galE*, acumula galactose-1-fosfato e UDP galactose. Tal acúmulo de produtos intermediários leva à morte bacteriana por lise, que ocorre após a adição de galactose ao meio de cultura da Ty21a. Este fator garante, em parte, a segurança da linhagem (Levine, *et al.*, 1989).

Extensivos estudos em voluntários estabeleceram que essa linhagem apresenta eficiência como vacina, e trabalhos de campo foram realizados no Chile, comprovando esse fato. Após várias modificações na formulação da vacina para estabelecer as melhores condições de apresentação, a linhagem foi licenciada em muitos países (Dogan, 1994).

1.3- LINHAGENS ATENUADAS GENETICAMENTE DEFINIDAS

Apesar da linhagem Ty21a ser comercializada como vacina oral para febre tifóide, possui a grande desvantagem de ser geneticamente indefinida, além de ser necessária a aplicação de várias doses. A seleção de mutações com nitrosoguanidina provocou várias mutações além da *galE*, entre elas, ausência do antígeno Vi, inabilidade de produzir H₂S e requerimento de valina e isoleucina para crescimento em meio mínimo. Além disso, em estudos realizados com um mutante *galE* geneticamente definido em voluntários humanos, observou-se o aparecimento de sintomas de febre tifóide entre os vacinados (Hone *et al.*, 1987 e 1988), confirmando que somente a mutação *galE* não seria suficiente para a atenuação da linhagem. Portanto, a definição genética das mutações foi um passo importante e essencial para o desenvolvimento de linhagens atenuadas. Outro ponto que acelerou esse desenvolvimento foi a utilização de camundongos como modelo de estudo, empregando-se linhagens de *S. Typhimurium* e outros sorotipos, que são altamente virulentos e matam os animais geneticamente susceptíveis causando uma infecção invasiva, similar à que *S. Typhi* causa em humanos.

Bruce Stocker e colaboradores desenvolveram um sistema a partir de observações feitas pelo grupo de Bacon nos anos 50, de que três classes de mutantes auxotróficos de *S. Typhi* apresentavam virulência reduzida (em camundongos) quando possuíam mutações requerendo uma purina ou purina mais tiamina, auxotrofia para ácido aspártico ou ácido para-aminobenzóico. Ele reiniciou os estudos empregando transposons para obter mutantes auxotróficos estáveis para os componentes citados anteriormente em linhagens apropriadas de *Salmonella* (Hoiseth & Stocker, 1981).

Em *E. coli* e espécies próximas como *Salmonella*, um bloqueio na via biossintética de componentes aromáticos (Figura 1) causa uma dependência para esses compostos, incluindo dois que não estão disponíveis (ou se encontram em concentrações muito baixas) em tecidos de mamíferos, sendo eles os ácidos *p*-aminobenzóico (precursor do ácido fólico) e 2,3 dihidroxibenzóico (precursor de um componente da enteroquelina). A deleção ou inversão gerada pelo transposon inserido

no gene *aroA* causa uma virtual perda de virulência em *S. Typhimurium* (Hoiseth & Stocker, 1981), e foi verificado que linhagens de *S. Typhimurium* e *S. Dublin* com mutações *aroA* geram resultados promissores como vacinas vivas orais ou parenterais em camundongos, bezerros (Hoiseth & Stocker, 1981; Robertsson *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1983 e 1984) e ovelhas (Muukkur *et al.*, 1987).

Com o intuito de aumentar a segurança da linhagem empregada como vacina-viva, foi introduzida uma segunda mutação por deleção, no gene *purA*, causando dependência para adenina ou um componente assimilável, como adenosina (Edwards & Stocker, 1988). Estas exigências nutricionais tornaram o mutante de *S. Typhi* (541Ty) incapaz de manter o crescimento em tecidos de mamíferos. Uma terceira mutação, no gene *hisG*, serve como marcador genético, sem afetar a virulência. Em estudos iniciais em humanos, com aplicação via oral, a linhagem mostrou ser segura, mas pouco imunogênica, gerando melhores resultados na imunidade mediada por células (Levine *et al.*, 1987). Numa tentativa de se explicar o fato, foram feitas construções de uma série de derivados de *S. Typhimurium* portando mutações estáveis no gene *aroA* ou *purA*, isoladamente ou ambas numa mesma linhagem. Os resultados em camundongos mostraram que os efeitos das mutações *purA* causam maior atenuação do que *aroA*; além de persistirem em quantidade menor (no fígado e baço), embora por mais tempo, falham na indução de imunidade (O'Callaghan *et al.*, 1988).

Outras linhagens atenuadas vêm sendo desenvolvidas. Dougan e colaboradores (1988) mostraram que duplos mutantes na via *aro*, com modificações nos genes *aroA* e *aroC* ou *aroD* (Figura 1), são atenuados no mesmo grau que um mutante *aroA*. Uma linhagem de *S. Typhi* com mutação em dois genes da via aromática já se encontra em fase de estudos com voluntários (Chatfield *et al.*, 1992a; Tacket *et al.*, 1992a; Dougan, 1994; Gonzalez *et al.*, 1994).

Uma outra classe de mutantes em estudo possui mutações que removem a capacidade da linhagem sintetizar ou responder à AMPc (*cya-crp*), e tais mutações são altamente atenuantes para *S. Typhimurium* (Curtiss & Kelly, 1987). O mecanismo de atenuação não está totalmente esclarecido; o reduzido crescimento *in vitro* comparado com a cepa selvagem poderia permitir que infecções de tal linhagem

fossem eliminadas da circulação mais facilmente do que infecções com salmonela selvagem. Camundongos alimentados com uma linhagem *cya-crp* e, subsequentemente, desafiados com uma linhagem virulenta foram protegidos. Uma linhagem de *S. Typhi* com as mesmas mutações também já foi testada em humanos e, recentemente, foi publicado um trabalho comparando essa linhagem com a *aroA/aroC* (Tacket *et al.*, 1992b).

Outras mutações que têm sido testadas como modelo incluem *phoP* (Miller *et al.*, 1989; Hohmann *et al.*, 1996), *htrA* (Johnson *et al.*, 1991; Chatfield *et al.*, 1992b; Strahan *et al.*, 1992), *ompR* (Dorman *et al.*, 1989, Chatfield *et al.*, 1991) e *hemA* (Benjamin *et al.*, 1991). O principal fator limitante para o teste de tais vacinas é a disponibilidade de voluntários humanos. Potencialmente, o principal empecilho para produzir uma vacina para febre tifóide, geneticamente definida, é a obtenção de uma combinação correta entre boa imunogenicidade (onde deve ocorrer a produção de citocinas e outros mediadores potentes) e respostas inflamatórias diversas (que podem estar associadas com uma forte resposta imune). Informações obtidas a partir do estudo com voluntários são a melhor maneira de se conseguir respostas precisas (Dougan, 1994).

1.4- UTILIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *SALMONELLA* EXPRESSANDO ANTÍGENOS HETERÓLOGOS

Trabalhos para o desenvolvimento de novas vacinas têm mostrado que linhagens atenuadas de *Salmonella* podem gerar imunidade protetora e induzir resposta secretória, humoral e celular anti-salmonela, após imunização oral. Essas vacinas vivas são potentes imunógenos orais. Além disso, a utilização do modelo em camundongos levou ao desenvolvimento de inúmeras linhagens racionalmente atenuadas e que potencialmente podem proteger contra febre tifóide e outras infecções causadas por

Salmonella, podendo ser usadas como carregadoras de antígenos heterólogos (Chatfield, 1989).

Um grande número de antígenos tem sido expresso em linhagens atenuadas de *Salmonella* (Clements, *et al.*, 1986; Poirier *et al.*, 1988; Sadoff *et al.*, 1988; Molina & Parker, 1990; Hess *et al.*, 1996; Londoño *et al.*, 1996). Estes mutantes são capazes de estabelecer uma infecção limitada no hospedeiro e liberam uma série de antígenos sintetizados *in vitro* ou *in vivo* diretamente aos linfócitos B e T, presentes no tecido linfóide associado ao intestino (“gut-associated lymphoid tissues”: GALT). As células B, assim sensibilizadas, migram aos linfonodos mesentéricos, onde iniciam a diferenciação, entram na circulação geral via ducto torácico e, subsequentemente, populam o intestino e outros tecidos da mucosa, onde ocorre a expansão clonal e diferenciação terminal em células de plasma. Imunização com essas vacinas multivalentes é uma forma efetiva de induzir a produção de anticorpos de mucosa assim como a imunidade mediada por células, tanto contra a *Salmonella* carregadora, como contra o antígeno heterólogo de interesse (Clements, 1987).

Um dos primeiros antígenos expressos em *Salmonella* atenuada na via aromática foi a subunidade B da enterotoxina termo-lábil (LT-B) de *E. coli* (Clements *et al.*, 1986; Maskel, *et al.*, 1987). Usando este antígeno, foi possível detectar tanto resposta sistêmica, quanto secretória. LT-B é produzida com uma proteína secretada, mas foi demonstrado que, na *Salmonella* atenuada, a proteína, que é citoplasmática, foi reconhecida pelo sistema imune, gerando resposta tanto humoral, quanto celular (Brown *et al.*, 1986). Esta observação surpreendeu muitos pesquisadores que acreditavam que os antígenos deveriam necessariamente estar presentes na superfície para serem reconhecidos.

Diversos trabalhos vêm sendo conduzidos para melhor caracterização da resposta imune obtida contra *Salmonella*, estudando diferentes parâmetros como via de imunização (Hopkins *et al.*, 1995; Srinivasan *et al.*, 1995), compartimentalização e quantidade de antígeno, viabilidade da linhagem carregadora (Wick *et al.*, 1993 e 1994; Cárdenas & Clements, 1993; Cárdenas *et al.*, 1994;), fatores de virulência (Fayolle *et al.*, 1994; Wick *et al.*, 1995) e estudo do tipo de resposta (Sadoff *et al.*,

1988; Flynn *et al.*, 1990; Pfeifer *et al.*, 1993; Verjans, *et al.*, 1995; Verma *et al.*, 1995a e 1995b; VanCott *et al.*, 1996).

Um problema do uso dessas linhagens como vacinas em humanos é que a maioria delas carrega a informação clonada em plasmídios recombinantes com alto número de cópias. Esses plasmídios geralmente possuem genes de resistência a antibióticos como marcadores, o que facilita a identificação e mantém a pressão seletiva, favorecendo a retenção do plasmídio. Vários autores têm descrito a instabilidade de tais plasmídios, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Cárdenas & Clements, 1993; Flynn *et al.*, 1990; Sadoff *et al.*, 1988; O'Callaghan *et al.*, 1988). Inicialmente, a inserção dos genes dos antígenos heterólogos no cromossomo parecia uma boa alternativa para a estabilização, entretanto a limitação do número de cópias do gene tem expressivo reflexo na concentração de antígeno apresentado ao sistema imune, o que acaba afetando a resposta. De fato, existem evidências de que um dos fatores mais importantes no desenvolvimento da resposta imune contra um antígeno heterólogo seria a quantidade inicial de antígeno que atinge o GALT e não a persistência da linhagem vacinal nos tecidos (Cárdenas e Clements, 1993; Cárdenas *et al.*, 1994; Wick *et al.*, 1994).

Qualquer forma de instabilidade é inaceitável, principalmente na produção de grandes lotes de vacinas. Em adição à instabilidade, a presença de resistência a antibióticos ou seqüências de DNA heterólogo cria problemas na parte legislativa para legalização de vacinas. Esses problemas vêm sendo abordados com o estudo de plasmídios portadores de genes essenciais para a sobrevivência da bactéria no hospedeiro que servem como marcadores e, ao mesmo tempo, aumentam a estabilidade. Curtiss e colaboradores (1990) desenvolveram um sistema onde uma linhagem de *Salmonella* atenuada possui uma mutação no gene *asd*, e a falta de ácido diaminopimélico no meio é letal aos mutantes. O gene *asd* é colocado em um plasmídio juntamente com o gene heterólogo e, quando acontece a perda do plasmídio, ocorre a eliminação dessas bactérias.

Uma outra abordagem utilizada emprega um plasmídio em que a expressão está sob controle do promotor *nirB* (nitrito redutase) de *E. coli*, ativado em

condições de baixa tensão de oxigênio. Essa condição de anaerobiose ocorre nos tecidos em que *Salmonella* se encontra após invasão da mucosa intestinal. Assim sendo, o antígeno de interesse é produzido exclusivamente quando a linhagem está no organismo vacinado. Plasmídios contendo genes clonados sob controle do promotor *pnir* demonstraram ser altamente estáveis *in vivo* e *in vitro* (Chatfield *et al.*, 1992c; Everest, *et al.*, 1996). Resultados bastante promissores foram obtidos pela expressão do fragmento C da toxina tetânica em *Salmonella* Typhi usando tal sistema (Chatfield *et al.*, 1992a e 1992c). O vetor utilizado possui o gene da β -lactamase, mas outros vetores podem ser desenvolvidos, em que genes de resistência a antibióticos não estejam presentes (Chatfield *et al.*, 1992c; Karen *et al.*, 1995).

A investigação genética detalhada, utilizada para obtenção de linhagens atenuadas de *Salmonella*, tem sido um forte estímulo para experimentação com outros patógenos bacterianos. Por exemplo, mutações do tipo *aroA* foram introduzidas em uma variedade de bactérias e, em alguns exemplos, os mutantes obtidos são atenuados (Roberts *et al.*, 1989; Bowe *et al.*, 1989; O'Goara *et al.*, 1989; Chamberlain *et al.*, 1993; Karnell *et al.*, 1993).

1.5- USO DO FLAGELO DE *SALMONELLA* COMO CARREGADOR DE EPITOPOS HETERÓLOGOS

Alguns pesquisadores acreditam que é vantajosa a apresentação de antígenos heterólogos na superfície do organismo que entrará em contato com o sistema imune. Vários sistemas de secreção têm sido desenvolvidos para expressar determinantes antigênicos heterólogos na superfície (Chatfield *et al.*, 1989). Como exemplo disso, podemos citar a inserção de peptídeos em *LamB* (Charbit *et al.*, 1988) e *PhoE* (Agterberg *et al.*, 1987), ambas proteínas da membrana externa.

Em 1989, Newton e colaboradores iniciaram o desenvolvimento de vetores para exposição de antígenos a partir de flagelo bacteriano. A idéia baseia-se

em duas observações: a elevada imunogenicidade do flagelo bacteriano e a existência de grande variabilidade de antígenos flagelares na natureza (Kauffman, 1975), sugerindo que muitas composições de aminoácidos são compatíveis com a função flagelar. Flagelos bacterianos são fortemente imunogênicos; a injeção de bactérias flageladas vivas ou mortas em infecção natural ou experimental, regularmente leva à produção de altos títulos de anticorpos. Os sorotipos de *Salmonella*, convencionalmente chamados espécies (cerca de 2.000), são definidos por diferentes combinações de antígeno O (polissacarídeo da cadeia de LPS) e antígeno H (flagelar). Muitos sorotipos de *Salmonella* têm dois antígenos flagelares, dos quais somente um é expresso em determinado momento na bactéria (Stocker & Newton, 1994).

A estrutura fundamental do flagelo é essencialmente conservada, de *Archae* a *Bacteria* (Harshey & Toguchi, 1996). A estrutura e funcionamento do flagelo tem sido melhor estudada em *E. coli* e *S. Typhimurium*, apresentando basicamente o mesmo sistema. O flagelo é morfolologicamente dividido em três partes: o filamento, o gancho e a estrutura basal. O filamento e o gancho são externos à célula, enquanto a estrutura basal é ancorada nas membranas internas e externas. O filamento é uma estrutura helicoidal e a maior porção do flagelo, estendendo-se por mais de 10 μm e, quando movido pelo motor, trabalha como propulsor. O gancho situa-se entre o filamento e a estrutura basal e funciona como uma junta. Acredita-se que a estrutura basal contém todos os componentes necessários para o funcionamento flagelar.

A expressão dos genes flagelares é rigorosamente controlada por uma hierarquia gênica. Em *Salmonella*, 50 genes são arranjados em grupos compostos por 17 operons e esses são divididos em três classes (I, II, III), de acordo com a ordem em que são expressos. Os genes regulatórios da classe I, *flhD* e *flhC*, são controlados por sinais como o nível de AMPc, Cap (sensibilidade à glicose), OmpR fosforilado (sensibilidade à pressão osmótica) e proteínas de choque térmico. Os produtos de *flhD* e *flhC* controlam positivamente a transcrição dos genes da classe II muitos dos quais codificam componentes necessários para o estágio inicial do corpo-basal. Um dos genes ativados codifica um fator de iniciação de transcrição (fator σ^{28}) que aciona os genes da classe III, específicos para genes flagelares e que serão expressos a seguir.

Essa organização temporal coincide aproximadamente com as etapas de formação do flagelo funcional, em que genes codificando proteínas necessárias nos estágios iniciais de formação da estrutura são expressos primeiro. Um fato interessante é que a estrutura basal e o gancho devem estar completos antes dos genes necessários para o filamento e sistema sensorial (os quais são aparentemente independentes do motor) serem expressos (Aizawa, 1996).

Vários genes da flagelina (*a*, *c*, *d*, e *i*) foram clonados e sequenciados, e a comparação das seqüências possibilitou a divisão das diversas proteínas em oito diferentes regiões de homologia (Figura 2). Duas regiões terminais mostraram-se idênticas na seqüência de aminoácidos em todas as quatro flagelinas analisadas, com 100% de homologia. A região central (cerca de 350 pb) mostrou ser hipervariável, com não mais que 30% de homologia (Wey & Joys, 1985). Resultados da literatura indicam que a região central do gene é capaz de aceitar grandes alterações sem prejuízo da função flagelar (Wey & Joys, 1985; Joys, 1985). Essa flexibilidade do sistema é especialmente evidente no caso de *E. coli*, em que o gene *hag*, que codifica uma flagelina com 497 aminoácidos, pode ser deletado a ponto de gerar uma flagelina funcional com apenas 310 resíduos, portanto, uma deleção correspondente a 37% da proteína (Kuwayama, 1988).

A região hipervariável central codifica determinantes antigênicos presentes no filamento flagelar, sendo, portanto, adequada para a inserção de epitopos a serem expostos. O vetor construído, pLS408 (Figura 3), derivado do pUC19, contendo o gene da flagelina de *S. Muenchen*, apresenta um sítio único de *EcoR* V na região central do gene que é utilizado para a inserção de oligonucleotídeos, especificando os epitopos de interesse. O primeiro epitopo inserido na flagelina (Newton *et al.*, 1989) foi uma seqüência de 15 aminoácidos da subunidade B da toxina colérica CTP-3 (Jacob *et al.*, 1983). Clones recombinantes foram capazes de sintetizar flagelina, formar filamentos flagelares e apresentar motilidade. Immunoblots feitos usando anticorpo contra o antígeno flagelar ou contra toxina colérica evidenciaram uma banda com peso molecular esperado, capaz de reagir com ambos os anticorpos presentes exclusivamente nos clones recombinantes. Quando observados ao

microscópio óptico, clones portadores de flagelos híbridos foram imediatamente imobilizados por anticorpos contra toxina colérica, não tendo qualquer efeito contra a bactéria portadora do flagelo selvagem.

Marcação com anticorpo contra toxina conjugado a partículas de ouro coloidal, seguida de observação ao microscópio eletrônico, comprovou reação exclusiva ao filamento flagelar de clones recombinantes. Uma linhagem *aroA* de *Salmonella* Dublin, portadora do gene híbrido de flagelina-toxina colérica, foi injetada em camundongos em três doses semanais. Anticorpo específico contra o peptídeo inserido e reativo contra a toxina de cólera foi produzido em todos os animais, conforme demonstrado por ELISA. Resultados semelhantes foram obtidos também com coelhos.

Outras inserções também foram realizadas: epitopos do vírus da hepatite B (Wu *et al.*, 1989), epitopos da proteína M de *Streptococcus pyogenes* (Newton *et al.*, 1991), epitopo de hemaglutinina do vírus Influenza (McEwen *et al.*, 1992), epitopos do vírus HIV (Newton *et al.*, 1995a) entre outras (Stocker & Newton, 1994). Em todos os casos, ocorreu produção de anticorpos em animais de laboratório, embora nem sempre as construções tenham originado flagelos funcionais. Esses resultados indicam que o sistema flagelar se apresenta como uma opção viável para biotecnologia de vacinas. Apesar da perda de motilidade ocorrida em alguns casos, o sistema apresenta boas vantagens como sistema de expressão de antígenos heterólogos. O fato da flagelina híbrida contendo o epitopo, estar presente em múltiplas cópias como parte do filamento, e cada um deles ser formado por milhares de subunidades, faz com que cada bactéria carregue até cem mil cópias de um epitopo individual. Além disso, a replicação da bactéria dentro de um compartimento endossômico das APCs do hospedeiro continuando a produzir flagelos deve fornecer quantidades substanciais de flagelina quimérica para o processamento e apresentação ao sistema imune (Verma *et al.*, 1995a).

Duas estratégias são interessantes para a otimização do sistema flagelar como carregador de epitopos: a obtenção de vetores altamente estáveis *in vivo* e a utilização de sítios adicionais na molécula de flagelina, aumentando seu potencial de

exposição de seqüências heterólogas. A integração de genes no cromossomo bacteriano é uma forma de estabilização que vem sendo estudada por vários grupos de pesquisadores (Brey *et al.*, 1991; Acero-Reys, 1994; Verma *et al.*, 1995a). A utilização de sítios adicionais, foco central do nosso trabalho, é uma estratégia fundamentada em dados da literatura que demonstram a existência de outras regiões da molécula com atividade antigênica. Recentemente, foi feito um mapeamento dos epitopos do antígeno flagelar-d de *Salmonella* Muenchen, comprovando a existência de duas outras regiões com epitopos flagelares capazes de serem reconhecidos por diferentes anticorpos contra flagelina (Joys & Schöedel, 1993), além de um determinante antigênico adicional na região IV, diferente do utilizado para inserção de epitopos heterólogos. Esses epitopos naturais encontram-se nas regiões V e VI, portanto essas duas regiões poderiam, teoricamente, ser utilizadas para a inserção de epitopos heterólogos de forma similar à realizada para a região IV.

Neste trabalho, foi explorada a inserção de um epitopo heterólogo em diferentes regiões da flagelina. O epitopo utilizado corresponde a 15 aminoácidos da região N-terminal da proteína M, da linhagem de *S. pyogenes* tipo 5 (Newton *et al.*, 1991), que foi inserido em diferentes regiões do gene. A proteína M de *Streptococcus pyogenes* tipo 5 é descrita como sendo o principal fator de virulência desse grupo. É uma proteína de membrana e tem propriedades opsonizantes que impedem as bactérias de serem fagocitadas. Uma significativa proporção de pessoas infectadas com certas linhagens do grupo A desenvolve doenças auto imunes, tais como febre reumática e doença cardíaca. A descoberta de que antígenos de *Streptococcus* do grupo A induzem uma resposta cruzada contra antígenos do tecido cardíaco humano tem aumentado o interesse em obter uma vacina contra esses patógenos.

Uma das estratégias empregadas foi a da expressão da proteína M em uma linhagem atenuada de *Salmonella* Typhimurium, SL3261. Essa linhagem foi utilizada para imunização de camundongos, via oral. Os animais produziram anticorpo opsonizantes, e foram protegidos quando desafiados com uma linhagem homóloga de *Streptococcus pyogenes* tipo 5, mas não contra o tipo 24. Além disso, os anticorpos produzidos não apresentaram resposta cruzada contra fibra cardíaca humana,

presumivelmente uma consequência do modo diferente de entrega dos antígenos ou da quantidade baixa de proteína M (Porier *et al.*, 1988).

Experimentos empregando peptídeos sintéticos correspondentes a diversas regiões dessa proteína revelaram que a região amino terminal dos tipos 5 e 6 contêm epitopos protetores que não induziram anticorpos com resposta cruzada à fibra cardíaca (Beachey *et al.*, 1981, 1984). A utilização desses epitopos para obtenção de uma vacina apresentaria a vantagem de serem livres de determinantes auto imunes. Além disso, o uso de vacinas recombinantes permite a combinação de diferentes epitopos que poderiam ser suficientes para produzirem uma resposta imune protetora.

O epitopo S-M5, que corresponde a 15 aminoácidos da extremidade amino, foi introduzido primeiramente na região IV da flagelina (Newton *et al.*, 1991), a partir do plasmídeo pLS408. Após inserção deste vetor em uma linhagem de *Salmonella* Dublin, foi obtida a linhagem SL7127, portadora do gene da flagelina híbrido. O gene de flagelina recombinante levou à produção de flagelina híbrida, que foi montada em filamentos funcionais, como indicado pela presença de motilidade na linhagem SL7127. A proteína híbrida foi detectada em imunoblot, tanto com anticorpo contra flagelina, quanto contra o epitopo. Além disso, o epitopo heterólogo foi detectado na superfície dos filamentos com a utilização de anticorpo marcado com ouro coloidal específico contra ele.

Resposta imune ao antígeno flagelar e ao epitopo S-M5 também foi observada em todos os animais imunizados (coelhos e camundongos), após injeção de flagelina purificada ou bactérias inteiras (tanto vivas, quanto inativadas) com a linhagem híbrida. Inicialmente, os títulos obtidos em ELISA contra a flagelina foram mais elevados do que contra o epitopo. Após 5 doses da linhagem SL7127 viva (intraperitoneal), os títulos contra o epitopo tornaram se semelhantes aos da flagelina. Ainda, a linhagem híbrida de *Salmonella* foi capaz de conferir proteção a camundongos imunizados e desafiados com a linhagem de *Streptococcus pyogenes* tipo 5. Os animais desafiados com a linhagem de *S. pyogenes* tipo 24 não sobreviveram, indicando que a proteção é tipo específica. Para podermos inserir o epitopo em regiões da flagelina previamente escolhidas, usamos o vetor pLS408 e um

derivado dele, o pLS503 (Figura 4). Essas inserções foram feitas a partir de diversos sítios de restrição conhecidos dentro do gene e com a adição de um adaptador (com sítios para as enzimas *Xho* I, *Cla* I e *Sma* I), para correção da fase de leitura, e posterior inserção do oligonucleotídeo, especificando o epitopo heterólogo.

2- OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo estudar a inserção de um epítipo heterólogo em diferentes regiões da proteína flagelina, visando aumentar o conhecimento do sistema que emprega o flagelo de linhagens atenuadas de *Salmonella* como carregador de epítopos heterólogos e, se possível, melhorá-lo.

Para alcançar esse objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

1- Construção de plasmídios derivados do vetor pLS408, com inserção da sequência que codifica um epítipo heterólogo em diferentes locais no gene da flagelina;

2- Verificação da expressão da flagelina recombinante, utilizando “western-blot” e observação da motilidade das linhagens portadoras de tais plasmídios;

3- Análise da capacidade imunogênica das linhagens de *Salmonella* atenuadas, portadoras da flagelina recombinante (resposta humoral);

4- Comparação da resposta imune obtida empregando-se diferentes formas do antígeno.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- LINHAGENS BACTERIANAS

As construções feitas neste trabalho basicamente derivaram do plasmídio pLS408 e, primeiramente, foram manipuladas na linhagem de *Escherichia coli* JM101 até a fase final, com o seqüenciamento das mesmas. Após a confirmação das seqüências dos novos plasmídios, esses foram transferidos para linhagens de *Salmonella*, e os demais testes executados.

3.1.1- Linhagens de *E. coli*

- **Linhagem JM101-** A linhagem JM101 é $\Delta(lac-proAB)$ *supE thi* [F' , $lacI^qZ$ $\Delta M15$, *traD36*, *proAB*] (Sambrook *et al.*, 1989), e foi utilizada em todos os passos iniciais das clonagens.

- **Linhagem JM110-** A linhagem JM110 foi usada exclusivamente para a construção na região III. Empregando-se o DNA do plasmídio amplificado em JM101, ocorre a metilação do sítio da enzima *Cla* I do adaptador utilizado na clonagem, não permitindo a digestão com essa enzima. Com a linhagem JM110 a metilação não ocorre. O genótipo dessa linhagem é: *rpsL thr leu thi hsdR17* (r_k^- , m_k^+) *lacY galK galT ara tonA tsx dam dca supE44* $\Delta(lac-proAB)$ [F' , *traD36*, *proAB*, $lacI^qZ\Delta M15$] (Sambrook *et al.*, 1989).

3.1.2- Linhagens de *Salmonella*

- **Linhagem SL5928-** É uma linhagem atenuada *aroA* de *Salmonella* Dublin que não é movél devido ao seu único gene, *fliC(g,p)*, ter sido substituído, via transdução, por um *fliC(i)::Tn10* (um gene inativado pela inserção do transposon) que, por sua vez, confere resistência à tetraciclina (Tc^r). A linhagem resultante torna-se movél quando transformada com plasmídios contendo o gene *fliC(d)* selvagem ou quimérico (Newton *et al.*, 1989). Essa linhagem é usada como controle negativo (sem flagelina) nas imunizações e imunodeteccções.

- **Linhagem SL5930-** A linhagem SL5928, quando portadora do plasmídio pLS408, que contém o gene *fliC(d)* da flagelina, foi chamada de SL5930 (Newton *et al.*, 1989). Ela foi usada como controle positivo para motilidade e para imunização dos camundongos com o plasmídio sem inserto, e é resistente à ampicilina (Ap^r).

- **Linhagem SL7127-** Também é derivada da SL5928 (Newton *et al.*, 1991) e carrega o plasmídio pLS439 que possui um oligonucleotídeo que codifica o epitopo da proteína M (peptídeo S-M5) de *Streptococcus pyogenes* Tipo 5, inserido na região central (região IV) do gene da flagelina. Essa linhagem foi usada como controle positivo do plasmídio com o inserto na região IV.

- **Linhagem ICB5-** É produto da integração do gene selvagem da flagelina no cromossomo da linhagem SL7379 (Acero-Reyes, 1994).

3.2- PLASMÍDIOS BÁSICOS

3.2.1- pLS408

O plasmídio pLS408 é um derivado do pUC19, e possui um fragmento *EcoR* I cromossomal de 3.35 Kb, contendo o gene H1-d de *Salmonella* Muenchen. Esse gene tem uma deleção de 48 pb (correspondente a um fragmento *EcoR* V) na região hipervariável (Figura 3). Essa deleção reduz, mas não suprime a função flagelar como inferido da motilidade observada com a linhagem sem flagelina, SL5928, carregando o plasmídio pLS408, que foi chamada de SL5930 (Newton *et al.*, 1989). Essa deleção remove um ou mais epitopos do antígeno flagelar d.

3.2.2- pLS503

Esse plasmídio é derivado do pLS408. Foi originado a partir da deleção de parte do múltiplo sítio de clonagem do pUC19. Para isso, o pLS408 foi digerido com *Sma* I (sítio único no plasmídio) e, após confirmada a digestão, foi parcialmente digerido com *Hind* III. Após tratamento com a enzima Klenow (fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E. coli*) para preenchimento das extremidades protuberantes resultantes da digestão, o vetor foi religado com T4 DNA Ligase. A deleção da região *Hind* III-*Sma* I do múltiplo sítio de clonagem foi confirmada através de análise com enzimas de restrição (Figura 4).

3.3- PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, OLIGONUCLEOTÍDEOS E ANTICORPOS

Os oligonucleotídeos complementares de 48 pb, utilizados nas clonagens para as regiões III, IV e VI, foram sintetizados especificando os 15 aminoácidos terminais da proteína M tipo 5 e mais 3 bases, CTA (nomeado oligo M). Algumas bases foram trocadas em relação à sequência original de *S. pyogenes* para serem codons preferenciais para *Salmonella* (Newton *et al.*, 1991). Um sítio de *Kpn* I facilitou o reconhecimento de plasmídios recombinantes e o codon final adicionado (CTA = Leu), quando lido na orientação inversa (TAG), origina um codon de terminação, impedindo a síntese de flagelina em clones com o inserto invertido (Figura 5A). Para a inserção na região VIII, além dos 48 pb, foram adicionados mais alguns pares de base para corrigir a fase de leitura após digestão do vetor com *Sty* I e inserção do oligonucleotídeo (Figura 5B).

O peptídeo S-M5(1-15)c compreende 15 aminoácidos da extremidade amino terminal da proteína M tipo 5 madura com um resíduo de cisteína adicional para facilitar a conjugação a proteínas carregadoras (Newton *et al.*, 1991) (Figura 5A). O anticorpo contra o peptídeo S-M5 (1-15)c foi obtido em coelhos albinos da Nova Zelândia, de forma conjugada à hemocianina de “keyhole limpet”. Tanto o peptídeo quanto o anticorpo foram gentilmente cedidos pelo laboratório do Dr. Edwin H. Beachey.

O anticorpo contra a flagelina foi adquirido da Difco. É um antissoro feito em coelho com antígeno flagelar d, usado na maior parte dos experimentos, na diluição de 1:1000. Outros anticorpos utilizados no trabalho foram anti-IgG de coelho e camundongo conjugados à peroxidase (Gibco-BRL). Estes foram empregados na diluição 1:3.000 nos “western-blots” e ELISAs.

Os oligonucleotídeos com a sequência dos três sítios de restrição *Xho* I-*Cla* I-*Sma* I (adaptador XCS) foram sintetizados com 18 pb, em cadeias complementares (Figura 6A). Esse adaptador foi empregado para correção da fase de leitura do gene, após a digestão com enzimas de restrição utilizadas para abrir o gene nas regiões de interesse.

O anelamento das cadeias foi feito por aquecimento a 65°C, por três minutos e resfriamento lento até 30°C.

Outros oligonucleotídeos foram sintetizados para serem usados como iniciadores (“primers”) para seqüenciamento. Foram escolhidas seqüências específicas para cada região do gene da flagelina próximas aos pontos de inserção da seqüência do epitopo heterólogo. Na Figura 6B, estão as seqüências dos iniciadores e a região a que se ligam no DNA molde. O anelamento dos mesmos ao DNA está descrito no item 3.15.3.

3.4- MEIOS DE CULTURA

Basicamente, foram usados os meios completos YT e LB. Quando necessário, foi adicionada ampicilina (100 µg/ml) previamente à inoculação das linhagens. O meio sólido é obtido acrescentando-se 2,0% de ágar ao meio YT ou LB líquidos. A preparação está descrita em Sambrook *et al.*, (1989).

- **Meio YT:** composto por 0,8% de triptona, 0,5% de cloreto de sódio e 0,5% de extrato de levedura. O pH corrigido para 7,5 com NaOH.

- **Meio LB:** composto por 1,0% de triptona, 1,0% de cloreto de sódio e 0,5% de extrato de levedura; pH 7,5.

Outros meios foram utilizados somente em determinados procedimentos, como os relacionados a seguir:

- **Meio MacConkey** (Bacto MacConkey Agar desidratado, Difco): usado como recomendado pelo fabricante. Foi utilizado nos experimentos de persistência (item 3.17.4), além dos meios YT e LB sólidos.

- **Meio SOC**: 2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM cloreto de magnésio, 10 mM sulfato de magnésio, 10 mM cloreto de sódio. Os três últimos sais são adicionados a partir de uma solução estoque concentrada 10 vezes e autoclavada separadamente da triptona e extrato de levedura. Esse meio foi utilizado para a recuperação das células nas transformações por eletroporação.

- **Meio semi-sólido**: usado para a observação da motilidade das linhagens de *Salmonella*. Esse meio é composto pelas soluções abaixo, que são autoclavadas separadamente e misturadas previamente ao uso na proporção 3:2:1. Quando necessário, é adicionada ampicilina na mesma quantidade já mencionada, e o meio é aliquotado em tubos de vidro ou placas de petri.

Solução 1- composta por 16% de gelatina e 2,5% de meio nutriente (Oxoid).

Solução 2- ágar 0,6% e 3,75% meio nutriente.

Solução 3- meio L ou YT.

Os inóculos foram feitos com agulha de platina, perfurando a superfície do meio, após a solidificação do mesmo. Para comparação da motilidade das diferentes construções, os inóculos foram feitos a partir de colônias isoladas, e a superfície perfurada por cerca de 0,5 cm (no caso de tubos). O volume do meio colocado em cada tubo, e o tempo de crescimento foi o mesmo para todas as culturas.

3.5- TAMPÕES, SOLUÇÕES E OUTROS REAGENTES

3.5.1- Soluções para mini-preparação de DNA plasmidiano

Solução P1- 50 mM Tris-HCl pH 8,0

10 mM EDTA

100 µg/ml RNaseA

Solução P2- 0,2 N de NaOH

1,0% SDS

Solução P3- Acetato de potássio 2,55 M, pH 4,8 (pH ajustado com ácido acético glacial).

Tampão TE- 10 mM Tris-HCl pH 8,0

1 mM EDTA

Solução de RNaseA- 10 mg/ml em 50 mM acetato de sódio, pH 4,8; fervida em banho-maria por 10 minutos.

Todas as soluções foram feitas utilizando água destilada ou água MilliQ (água tratada com sistema MilliQ, da Millipore).

3.5.2- Soluções para eletroforese de DNA

TBE - 89 mM Tris-HCl

89 mM ácido bórico

20 mM EDTA

pH 8,0

- Estoque do tampão: concentrado 10 vezes.

Brometo de etídeo- solução estoque de 10 mg/ml, em água.

concentração final utilizada: 10 µg/ml

Agarose empregada: tipo II (Sigma) geralmente na concentração 0,7%, fundida em TBE 0,5x.

3.5.3- Tampões para enzimas não-restrição

Tampão para Klenow (concentrado 10x): 0,5 M Tris-HCl (pH 7,6)

0,1 M MgCl₂

Tampão para T4 DNA Ligase (concentrado 5x): 0,25 M Tris-HCl (pH 7,6)

50 mM MgCl₂

5 mM ATP

5 mM DTT

25% (w/v) PEG-8000

Tampão para Polinucleotídeo Kinase (concentrado 10x): 0,7 M Tris-HCl (pH 7,6)

10 mM MgCl_2

5 mM DTT

3.5.4- Soluções para seqüenciamento de DNA

Solução de desnaturação: 2 N NaOH

2 mM EDTA

Mistura de marcação do DNA: 7,5 μM dGTP

7,5 μM dCTP

7,5 μM dTTP

- diluída 5x, em água

Mistura de terminação: 80 μM dATP

80 μM dGTP

80 μM dCTP

80 μM dTTP

8 μM do seu respectivo dideoxinucleotídeo

50 mM NaCl

5,0 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ [α - ^{35}S]dATP

Tampão para diluição da Sequenase: 10 mM Tris-HCl pH 7,5

5 mM DTT

0,5 mg/ml BSA

Solução de terminação: 95% formamida

20 mM EDTA

0,05% azul de bromofenol

0,05% xilenocianol

Solução estoque de acrilamida: 31 g de acrilamida (concentração final: 6%)

1,65 g de bisacrilamida (concentração final: 0,3%)

230 g de uréia (concentração final: 7 M)

54 ml de TBE 10x (concentração final: 1x)

180 ml de água

- dissolver, completar com água para 540 ml;

- filtrar e deaerar.

3.5.5- Soluções para preparação de proteína purificada

Solução para lavagem das células: NaCl 0,9% (salina)

Tampão PBS: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. Composto por:

7,45 mM Na_2HPO_4

2,5 mM NaH_2PO_4

145 mM NaCl

água para 1 l;. solução estoque concentrada 10x.

3.5.6- Soluções para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE)

Solução estoque de acrilamida- concentração final 30%: 29 g acrilamida
1,0 g bisacrilamida

Tampão de amostra- 2% SDS
4% 2-mercaptoetanol
10% Glicerol
0,06 M Tris-HCl pH 6,8
4 mM EDTA
Azul de bromofenol adicionado livremente.

Solução de persulfato de amônio (APS)- 10%, em água

Soluções para o gel de acrilamida- os volumes das diversas soluções estão indicados abaixo (para concentração final 10%).

Gel de separação: 1,875 M Tris-HCl, pH 8,8	6 ml
0,2 M Na ₂ EDTA	300 µl
acrilamida (30%)	10 ml
água bidestilada	13,4 ml
10% SDS	300 µl

Deaerar e adicionar 300 µl de APS 10% e 25 µl de TEMED.

Gel de empilhamento: 1 M Tris-HCl pH 6,8	1,88 ml
0,2 M Na ₂ EDTA	150 µl
acrilamida (estoque)	2,5 ml

água bidestilada 10,3 ml

10% SDS 150 µl

Deaerar e adicionar 150 µl de APS e 20 µl de TEMED.

3.5.6.1- Soluções para coloração do gel

Solução para coloração: 0,25% Azul de Coomassie

50% metanol

10% ácido acético

Solução para descoloração: 5% metanol

7,5% ácido acético

Solução para fixação: 25% metanol

7% ácido acético

3.5.7- Soluções para “western-blot”

Tampão de transferência : 39 mM Glicina

20% Metanol

0,0375% SDS

48 mM Tris-HCl

Solução para lavagens do filtro: Tris-salina- 0,12% Tris-HCl

0,9% NaCl

Tampão para bloqueio e hibridação com o anticorpo: Tris-salina e 5% de leite desnatado (Molico)

Revelação (usando peroxidase): 0.06% de diaminobenzidina (DAB)
0,03% H_2O_2
- dissolver em PBS, pouco antes de usar.

3.5.8- Soluções para os ensaios imunoenzimáticos

Para flagelina, os ensaios foram realizados em placas Nunc (referência 269620), utilizando flagelina purificada (item 3.12). Para o peptídeo SM5(1-15), foram empregadas placas Nunc, referência 269787, que diferem das de flagelina por serem esterilizadas por radiação.

Tampão de cobertura: tampão carbonato 50 mM pH 9,6 (para flagelina)
tampão carbonato 50 mM pH 9,2 (para peptídeo)

Composição do tampão: NaHCO_3 2,93g
 Na_2CO_3 1,59 g
timerosal 0,1 g
água para 1 l; pH ajustado com NaOH.

Tampão de bloqueio e diluição dos anticorpos conjugados :
composto por: 1% gelatina em PBS (1x) e 0,05% Tween 20

Tampão de lavagem: PBS 1x e Tween 20 0,05%

Tampão para revelação: citrato-fosfato pH 5,0

composição do tampão: ácido cítrico 0,1 M- 4,9 ml

Na₂HPO₄ 0,2 M- 5,1 ml

água- 10 ml

antes do uso adicionar: OPD- 20 mg (concentração final 1 mg/ml)

H₂O₂- 8 µl (concentração final 0,012%)

Bloquear a reação com: 50 µl de H₂SO₄ 1 M

3.6- EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIANO

3.6.1- Preparação em média escala de DNA de plasmídio

O método descrito abaixo foi aplicado a 100 ml de cultura, em meio LB, crescida por 12 horas a 37°C. As células foram centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos. O precipitado com 1 grama ou menos foi ressuspensão em 4 ml de P1 modificada (sem RNase), até se obter uma mistura homogênea. Foram adicionados 4 ml de solução P2, para lise das células, e o conteúdo do frasco mantido sob agitação lenta por 1 a 5 minutos, até a solução se tornar translúcida. A solução P3 foi acrescida e a mistura agitada pelo tempo anterior. Após 15 minutos no gelo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 17.000 xg (4°C).

O sobrenadante foi transferido para um outro tubo e precipitado com o mesmo volume de isopropanol por 2 a 3 horas, a -20°C. Depois de centrifugado por 15 minutos a 17.000 xg, o isopropanol foi decantado e a parede do tubo seca com papel de filtro. O precipitado foi ressuspensão em 500 µl de água estéril, transferido para tubo eppendorf e novamente adicionadas soluções P2 (250 µl) e P3 (250 µl). Após

centrifugação de 2 minutos em minicentrífuga, adicionou-se isopropanol ao sobrenadante, efetuando-se nova centrifugação. O precipitado obtido foi dissolvido em 500 µl de água e a ele adicionados 300 µl de cloreto de lítio 8 M (concentração final 1 M). Após 5 minutos à temperatura ambiente, o material foi centrifugado 2 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo.

Depois de tratado com 50 µg de RNaseA, por 15 minutos, a 37°C, foi feita uma extração com fenol-clorofórmio (1:1) e uma de clorofórmio. O DNA foi precipitado com etanol absoluto e, após centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em 200 µl de tampão TE ou água MilliQ.

A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro (1 DO 260 nm = 50 µg/ml). A qualidade do material foi verificada por digestão com a enzima *EcoR* I e eletroforese, em gel de agarose, em tampão TBE 0,5x.

3.6.2- Mini-preparações de DNA de plasmídeo

Foi utilizado um procedimento de lise alcalina com adição de RNase, antes do rompimento das células. Neste processo, usou-se de 1 a 3 ml de uma cultura bacteriana, cultivada por cerca de 12 horas, feita a partir de uma colônia isolada. Após centrifugar a cultura por 1 minuto, o meio foi retirado e o precipitado bacteriano deixado o mais seco possível. As células foram ressuspenso completamente em 300 µl de solução P1 e, a seguir, adicionados 300 µl da solução P2, sendo o conteúdo dos tubos misturados por inversão. Após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, foi acrescida a terceira solução, 300 µl de P3, o volume dos tubos misturado novamente por inversão, e deixados no gelo de 30 a 60 minutos. Depois de microcentrifugação por 5 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi retirado, passado para um novo tubo, e feita nova centrifugação. O sobrenadante recuperado foi precipitado com 0,8 volumes de isopropanol. Os tubos foram deixados no gelo por 30 a 60 minutos e depois microcentrifugados a 4°C, por 15 minutos.

O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em 50 µl de água MilliQ estéril.

3.7- TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS

Eletroporação foi o procedimento utilizado para transformar *Salmonella* (SL5928) com DNA retirado direto de *E. coli* (JM101 ou JM110), sem necessidade de passar por uma linhagem de *Salmonella* que fosse deficiente nos três sistemas de restrição, como era feito anteriormente (Dower *et al.*, 1988). Esse procedimento também foi utilizado para transformar outras linhagens empregadas no trabalho.

As células para eletroporação foram preparadas como recomendado pelo fabricante do aparelho (Gene-Pulser, Biorad). O procedimento é iniciado com a diluição de um pré-inóculo de 5 ml, em 500 ml de meio LB e deixando-se crescer até DO 0,5 (600 nm). As células foram incubadas em gelo e, em seguida centrifugadas 15 minutos, a 3.000 xg. O precipitado foi ressuspenso em 500 ml de água MilliQ gelada, e o tubo centrifugado, como anteriormente. As células foram lavadas novamente em água gelada (250 ml), centrifugadas e ressuspensas em 50 ml de água gelada com 10% de glicerol. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 ml de água gelada, mais glicerol (10%), o volume final aliqotado em tubos com 40 µl que foram posteriormente congelados. As diversas alíquotas foram estocadas a -70°C.

A cada alíquota de células foi misturado de 1 a 2 µl (usou-se no mínimo 100 pg) de DNA e a mistura colocada no fundo de uma cubeta de eletroporação, sem permitir bolhas. A seguir, foi dado o pulso elétrico utilizando resistência de 200 Ohms, capacitância de 25 µF e 2.500 V (esses parâmetros foram recomendados pelo fornecedor do aparelho). Depois, 1 ml de meio SOC foi rapidamente adicionado na cubeta e transferido para tubo de ensaio, agitando a 37°C, durante 60 minutos. Em seguida, as

células foram plaqueadas em meio LB mais ampicilina e incubadas a 37°C, por cerca de 12 horas.

3.8- ANÁLISE DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As reações com diferentes enzimas de restrição foram realizadas como recomendado pelos fornecedores das mesmas, utilizando-se, para cada enzima, o tampão e temperaturas indicados. Outros cuidados também foram tomados como, por exemplo, usar entre 1 a 5 unidades da enzima de restrição por µg de DNA digerido e não permitir que o volume da enzima ultrapassasse 1/10 do volume final da reação.

Quando necessária a digestão com mais de uma enzima com tampões incompatíveis, foi retirado o primeiro tampão, precipitando-se o DNA com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e dois volumes de etanol absoluto. Após ressuspender-se o DNA no volume desejado, seguia-se com outra reação.

Utilizamos as seguintes enzimas de restrição: *Bam*H I, *Cla* I, *Hind* III, *Eco*R I, *Eco*R V, *Kpn* I, *Pst* I, *Sma* I, *Sty* I e *Xho* I. Todas as enzimas são da BRL e com 10 U/µl. A enzima *Hinc* II, utilizada em algumas análises de restrição, foi da Biolabs (10 U/µl).

3.9- REAÇÕES COM ENZIMAS DE MODIFICAÇÃO

3.9.1- Preenchimento de extremidades protuberantes do DNA

Em diversos passos das construções dos novos plasmídios, após a digestão do DNA com algumas enzimas de restrição, foi necessário o preenchimento das extremidades protuberantes originadas por algumas enzimas. As extremidades, todas 3' recessivas, foram completadas com nucleotídeos, usando-se a enzima Klenow (BRL), em tampão apropriado (item 3.5.3), como recomendado em Sambrook *et al.*(1989).

Para 0,2 a 5 µg de DNA, empregamos 1 mM de cada um dos dNTPs necessários e 1 unidade de Klenow por µg de DNA, em volume final de 20 µl. Após incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, a enzima foi inativada por 10 minutos, a 70°C e o DNA usado diretamente em reações de ligação.

3.9.2- Ligação de fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA a serem ligados e a enzima T4 DNA Ligase (BRL) foram misturados, juntamente com o tampão apropriado (item 3.5.3), num volume de 20 µl. Para ligações de fragmentos de DNA entre 0,5 a 1,0 Kb, foi empregada uma concentração molar 2 vezes maior que a do vetor. No caso da ligação de adaptadores, a concentração molar utilizada foi da ordem de cem vezes à do vetor. A incubação da reação foi feita pela noite, a 16°C, ou por 6 horas, à temperatura ambiente.

3.9.3- Fosforilação de adaptadores

Os adaptadores não fosforilados foram tratados com a enzima Polinucleotídeo kinase do fago T4 (Biolabs). O procedimento seguido está descrito em Sambrook *et al.* (1989). Para 0,5 a 2,0 μg de adaptadores não fosforilados, foram utilizados cerca de 2 unidades de enzima e 1 mM de ATP, em tampão adequado (item 3.5.3). A reação foi incubada por 1 hora, a 37°C. Os adaptadores foram usados em ligações posteriores, sem purificação prévia.

3.10- ELUIÇÃO DO DNA DA AGAROSE

Os fragmentos de DNA que necessitavam ser separados de outros em determinadas misturas, por exemplo, originadas de digestões com enzimas de restrição, foram separados por eletroforese, em gel de agarose.

O DNA da banda de interesse é retirado utilizando eletroeluição do DNA, em membrana de diálise, fervida previamente em solução de bicarbonato 2%, por 10 minutos, lavada em água destilada e, novamente, fervida em 1 mM de EDTA. A banda de agarose com o DNA foi cortada e colocada dentro da membrana previamente tratada, lavada em água destilada e preenchida com TBE 0,5x. A eletroeluição foi feita por cerca de 2 horas, a 80V. Após esse período, a corrente foi invertida por 2 minutos, o tampão do interior da membrana retirado e passado por lã de vidro siliconizada, para retenção de resíduos de agarose. Em seguida, o DNA foi precipitado com 0,1 volume de cloreto de sódio 5 M e 2 volumes de etanol absoluto e, depois de centrifugado por 20 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70%, e seco. O material final foi ressuspenso em 20 a 30 μl de água e uma alíquota observada em gel de agarose 0,7%.

3.11- PREPARAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

As colônias de interesse foram crescidas até fase log, a 37°C, sob agitação constante, em meio LB. O volume da cultura a ser utilizado na preparação é calculado dividindo-se a DO obtida em 600 nm por 4,8. Depois de centrifugado a 3.000 xg, por 15 minutos, o precipitado de células foi lavado em 1,5 ml de salina e, finalmente, ressuspenso em 300 µl de tampão de amostra (item 3.5.6), fervido 5 minutos, e 30 a 35 µl utilizados como amostra para gel de poliacrilamida, o que corresponde a, aproximadamente, 2×10^8 células.

3.12- PREPARAÇÃO DE FLÁGELINA PURIFICADA

As linhagens de *Salmonella* que foram utilizadas para a extração do flagelo foram inoculadas em 500 ml de meio LB, com 100 µg/ml de ampicilina, e incubadas a 37°C durante a noite. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 xg, lavadas duas vezes com salina e, após nova centrifugação de 10 minutos, a 3.000 xg, ressuspensas em 6 ml de PBS. Foram adicionadas cerca de 2 g de pérolas de vidro (150 a 212 µm, Sigma, referência G1277), e a mistura agitada em vortex por 5 minutos. Após a remoção das células por centrifugação, a 10.000 xg, 20 minutos e a 4°C, o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore de 0,45 µm. O material recolhido foi centrifugado a 100.000 xg, por 1 hora, a 4°C e o precipitado formado foi ressuspenso em 500 µl de ácido clorídrico 0,01 N. Após 15 minutos no gelo, para completar a dissociação dos flagelos, o material insolúvel foi retirado por centrifugação a 100.000 xg por 1 hora.

O sobrenadante com a proteína purificada foi neutralizado com NaOH, precipitado com sulfato de amônio, para concentração final 2,67 M, durante 16 horas, a 4°C, como descrito em Ibrahim *et al.*(1985) (com modificações). Após centrifugação de

15.000 xg, por 15 minutos, a proteína precipitada foi ressuspensa em água, e o material colocado em membrana de diálise, deixado por 2 horas em água (com agitação), à temperatura ambiente e, depois, transferido para um novo volume de água, sendo deixado 18 horas, a 4°C (com algumas trocas da água da diálise).

A proteína obtida foi concentrada em filtros Amicon (Microcon-3: microconcentrador) e quantificada, usando-se o método de Bradford (Harlow & Lane, 1988), e observada em gel de poliacrilamida 10%.

3.13- GEL DE POLIACRILAMIDA PARA PROTEÍNAS

A separação das proteínas dos extratos celulares foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS (SDS-PAGE), em sistema descontínuo (Laemmli, 1970; Studier, 1973). As soluções e reagentes utilizados foram descritos anteriormente (item 3.5.6).

As amostras de proteína total ou flagelina purificada foram aplicadas no gel, depois de diluídas em tampão de amostra, e fervidas por 5 minutos. A corrida eletroforética foi feita a 60 mA, por cerca de 3 horas, ou até o corante sair do gel de separação.

Após a corrida, o gel era corado com azul de Comassie, ou as proteínas transferidas para filtro de nitrocelulose.

3.13.1- Coloração para proteínas

Após a eletroforese, o gel é mergulhado na solução para coloração por, no mínimo, 4 horas e depois descorado com a solução de descoloração (com algumas trocas

da solução). Em ambas as etapas, o gel é mantido sob agitação lenta. Após a descoloração, o gel é fixado por 45 minutos e seco a vácuo, com aquecimento, em secador de gel (Biorad).

3.14- "WESTERN-BLOT"

Esse procedimento foi empregado tanto para detecção da flagelina produzida pelas linhagens de *Salmonella* empregadas no trabalho, como da flagelina híbrida portadora do epítipo de proteína M. O material analisado foi obtido de extratos de proteína total ou de flagelina purificada, após separação por peso molecular, em gel de poliacrilamida.

3.14.1- Transferência de proteínas para filtro de nitrocelulose e tratamento do filtro

A transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para filtro de nitrocelulose foi realizada usando o sistema do tipo semi-seco, como descrito em Harlow & Lane (1988). Nesse sistema, o gel fica em contato direto com a membrana de nitrocelulose e entre folhas de papel de filtro (tanto a membrana, como o papel de filtro com o mesmo tamanho do gel), todas umedecidas com tampão de transferência (item 3.5.7). Esse “sanduíche” foi acondicionado entre duas placas, recobertas por uma camada de grafite, umedecidas em água destilada. Essas placas fazem parte do sistema Multiphor II (Pharmacia) para a transferência de proteínas. A transferência foi realizada por cerca de uma hora, com uma corrente de 0,8 mA/cm² de gel. Após a corrida, o filtro foi tratado da seguinte maneira:

- **Bloqueio com solução 5% de leite desnatado em Tris-salina**- o bloqueio foi feito para prevenir adsorção não específica dos anticorpos utilizados por, no mínimo, 2 horas, com agitação lenta;

- **Incubação do filtro de nitrocelulose com anticorpo primário direcionado contra proteína alvo** - os dois anticorpos utilizados foram contra a flagelina (diluição 1:1.000), e contra o peptídeo SM5, da proteína M (diluição 1:1.000), ambos produzidos em coelho. A incubação do filtro com o anticorpo foi mantida por duas horas, em solução de leite-Tris-salina, à temperatura ambiente com agitação lenta.

- **Lavagem do filtro de nitrocelulose após incubação com primeiro anticorpo** - o filtro foi lavado 4 vezes, por 5 minutos, com 50 ml de Tris-salina, à temperatura ambiente, com agitação lenta;

- **Incubação do filtro de nitrocelulose com reagente imunológico secundário** - o segundo reagente utilizado foi um anticorpo contra a imunoglobulina G, conjugada a peroxidase (diluição 1:3.000, Gibco) . O filtro foi incubado com o reagente, por 2 horas, à temperatura ambiente, com agitação. O conjugado usado para os dois anticorpos primários foi um anticorpo contra a imunoglobulina G de coelho (produzido em cabra);

- **Lavagem do filtro após incubação com o segundo anticorpo**- foram feitas 3 lavagens com tris-salina e uma com PBS, por 5 minutos cada, com agitação lenta;

- **Adição de substrato cromogênico, DAB** - 6 mg de diaminobenzidina são dissolvidas em 10 ml de PBS, adicionados 10 µl de água oxigenada (30 volumes) e, em seguida, a solução foi despejada sobre o filtro. A reação de coloração foi interrompida, quando desejado, enxaguando o filtro com água destilada.

3.15- SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para o sequenciamento dos plasmídios obtidos, utilizamos o método de terminação com dideoxinucleotídeos, desenvolvidos por Sanger, como descrito em Sambrook *et al.*, (1989). Empregamos DNA dupla fita e iniciadores específicos para cada região sequenciada (item 3.3, Figura 6B).

3.15.1- Preparação do DNA molde (dupla fita)

3.15.1.1- Lise alcalina com RNase após a solução P1

Este método foi mencionado anteriormente (item 3.6.2) por produzir DNA de ótima qualidade para análise com enzimas de restrição. Para o sequenciamento, além do que foi mencionado, foi feita uma precipitação posterior do DNA com PEG 8000 e NaCl, para concentração final de 6,5% e 1 M, respectivamente. Após incubação no gelo por 30 minutos, o DNA foi centrifugado por 20 minutos, lavado com etanol 70% e seco sob vácuo. O precipitado obtido foi ressuspenso em 40 µl de água MilliQ estéril.

3.15.1.2- Preparação de DNA por QIAGEN

O DNA de plasmídios, preparado com os componentes e, segundo instruções do fabricante do kit QIAGEN, mostra-se de qualidade excelente. A partir dele, foi possível realizarmos o sequenciamento de diversas amostras. Resumidamente, esse protocolo utiliza as mesmas soluções da mini-preparação de DNA, com soluções fornecidas pelo Kit (soluções P1, P2, P3 e Rnase), além de uma coluna para purificação

do DNA e tampões para tratamento da mesma. O material obtido foi de alta qualidade e pureza.

3.15.2- Desnaturação do DNA

A desnaturação de cerca de 4 µg de DNA dupla fita (em volume final de 18 µl) foi feita com 2 µl da solução NaOH/EDTA para desnaturação (item 3.5.4), por 5 minutos, à temperatura ambiente. Depois de precipitar o DNA desnaturado por 15 minutos, com 2 µl de acetato de sódio 2 M, pH 4.6 e 75 µl de etanol absoluto, por 10 minutos, a -70° C, o material foi centrifugado, e o precipitado lavado com etanol 70%, seco e ressuspensão em 7 µl de água, seguindo-se, desse ponto, com o protocolo da Sequenase (USB).

3.15.3- Anelamento do “Primer”

O anelamento do DNA com o iniciador específico para cada região (item 3.3) foi feito a 65°C, por 3 minutos, misturando-se o DNA desnaturado e precipitado como descrito anteriormente, com 100 ng do iniciador e 2 µl de tampão para anelamento do “primer”. Após esse intervalo, o tubo foi transferido para recipiente com água a 65°C e permitido o resfriamento lento até 30°C. Uma vez abaixo dessa temperatura, os tubos foram colocados no gelo.

3.15.4- Reações de seqüenciamento

As reações foram feitas utilizando-se os reagentes do Kit para seqüenciamento com a enzima Sequenase (USB). Para cada reação, são utilizados 4 tubos com 2,5 µl das misturas de terminação. Esses tubos são marcados com A, T, C e G.

A mistura de marcação do DNA foi diluída 5 vezes (mistura de dGTP, dCTP, dTTP) em água MilliQ. A enzima foi diluída 8 vezes, em tampão específico, e mantida no gelo até o momento de utilização.

Ao DNA anelado (tubo mantido no gelo) são adicionados os seguintes compostos: 1 µl DTT 0,1 M, 2 µl de mistura de marcação do DNA, 0,5 µl [α -³⁵S]dATP (10 mCi/ml) e 2 µl da enzima diluída. Após incubação de 2 a 5 minutos, à temperatura ambiente, o volume do tubo é dividido entre os 4 tubos da mistura de terminação (3,5 µl para cada tubo) e incubado a 37°C, por 5 minutos. Após esse período são adicionados 4 µl da solução de terminação a fim de parar a reação anterior. As amostras são mantidas estocadas a -20°C até o momento da eletroforese.

3.15.5- Eletroforese da reação de seqüenciamento

A montagem do gel foi feita utilizando-se um par de placas de vidro (sistema S2- BRL com cerca de 17,1 x 32 cm), lavadas extensivamente com água, detergente e etanol. Depois de muito bem secas, as placas são superpostas, separadas por espaçadores de 0,4 mm de espessura, mantidas juntas por pressão de pinças metálicas, e colocadas na posição horizontal sobre um apoio nivelado. A resina é despejada a partir de uma seringa, com certa pressão, para que o preenchimento das placas seja lento e progressivo, o que auxilia na não formação de bolhas. As placas são siliconizadas previamente ao preenchimento com a resina, facilitando o espalhamento do gel e a transfêrencia deste para o papel de filtro no final da corrida.

O gel foi preparado com 50 ml da solução estoque de acrilamida (concentração final 6% de acrilamida), 100 µl de persulfato de amônio (10%) e 50 µl de TEMED. O tampão de corrida do gel é TBE 1,0x e a amperagem aplicada é de 35mA (essa amperagem é a recomendada para o tamanho das placas utilizadas). Após a corrida, o gel foi fixado em ácido acético 5% por 10 minutos, lavado com água destilada, transferido para papel Whatman 3MM e, finalmente, seco a vácuo por aproximadamente 1 hora, com aquecimento (80°C; em secador de gel, Biorad). A exposição do gel ao filme de raio X é feita por aproximadamente 24 horas, num cassete radiológico.

3.16- IMOBILIZAÇÃO DE *SALMONELLA* COM ANTICORPO

A linhagem a ser testada foi semeada em meio semi-sólido, com gelatina e colocada a 37°C, por cerca de 16 horas. Uma alíquota do meio, de uma região distante do inóculo inicial (quando a linhagem apresenta motilidade), é retirada com micropipeta e colocada em meio LB líquido (com antibiótico, quando necessário). As células foram incubadas por algumas horas a 37°C, com agitação suave. Utilizando o microscópio óptico, alíquotas das culturas vão sendo monitoradas até apresentarem motilidade perceptível. Para controle positivo e comparação das linhagens com os novos plasmídios, empregamos uma linhagem com motilidade.

A aplicação de anticorpos contra a flagelina (Difco), na porção da cultura observada, pode bloquear o movimento das células, devido à reação do anticorpo com o flagelo. Esse anticorpo é usado na diluição 1:20, em todas as linhagens testadas. No caso de linhagens não móveis, mas que possuem flagelos, podemos observar uma certa aglutinação das células. A presença de um epitopo heterólogo de interesse também pode ser detectada usando anticorpo específico contra ele, no nosso caso, o da proteína M.

3.17- ESTUDOS IMUNOLÓGICOS

3.17.1- Animais utilizados e preparação dos soros

Os camundongos utilizados foram da linhagem BALB/c, fêmeas, com 12 a 16 semanas de idade. Empregamos, em geral, 5 camundongos por grupo, para inoculação. A coleta de sangue dos animais foi feita entre 7 ou 8 dias após a inoculação, pelo plexo retro-orbital, obtendo-se cerca de 150 a 300 µl de sangue total, por animal. Esse procedimento foi realizado após a anestesia dos animais por inalação de atmosfera rica em éter etílico. Os soros foram recolhidos após coagulação do sangue coletado por 30 minutos, a 37°C, e incubação de 30 a 60 minutos, a 4°C, para retração do coágulo. Após centrifugação por 15 minutos, a 4.000 xg e 4°C, o sobrenadante foi retirado e estocado a -20°C.

3.17.2- Preparação dos antígenos utilizados nas imunizações

Os antígenos utilizados nos diversos experimentos foram linhagens de *Salmonella* ou a proteína flagelina purificada de algumas linhagens. O modo de preparação desses antígenos está descrito a seguir.

3.17.2.1- Preparação das linhagens usadas como vacinas-vivas

As linhagens usadas como antígenos foram preparadas a partir da diluição 1:50 de culturas crescidas durante a noite, a 37°C. Essas culturas foram mantidas sob agitação até DO aproximada de 0,5 (600 nm). A quantificação das células foi baseada

numa curva de crescimento de *Salmonella* Dublin (DO_{600nm} x concentração bacteriana). As células foram então centrifugadas, lavadas com o mesmo volume de solução salina e, novamente, quantificadas a 600 nm. A seguir, foi feita diluição para obtenção do número de células de interesse, sendo essa solução final empregada para imunização dos camundongos. O número de bactérias inoculado foi confirmado com o plaqueamento de diluições seriadas das culturas.

3.17.2.2- Preparação das linhagens inativadas por calor

As linhagens usadas nesse experimento foram crescidas como descrito no item 3.17.2.1. Após atingirem uma D.O em torno de 0.5, as culturas foram transferidas para tubos de 40 ml e colocadas por 20 minutos, a 65°C, para inativação por calor. A seguir, as células foram sedimentadas por centrifugação (4.000 xg, 5 minutos) e lavadas com salina. A quantificação e preparação do inóculo final foi realizada como descrito no item anterior.

A comprovação da inativação foi feita através do plaqueamento de diversas diluições das culturas, em placas de meio sólido, com antibiótico, quando necessário.

3.17.2.3- Preparação de proteína purificada

A preparação de flagelina purificada foi necessária para utilização da proteína como antígeno, na inoculação de camundongos e, também, cobertura das placas usadas em ELISA; o procedimento está descrito no item 3.12. A proteína foi quantificada pela técnica descrita por Bradford (Harlow & Lane, 1988).

3.17.3- Imunizações: doses e esquemas

3.17.3.1- Imunizações com bactéria viva

As linhagens para imunização foram preparadas como no item 3.17.2.1. Foram utilizadas três doses de 5×10^6 bactérias/ 200 μ l (em solução salina) aplicadas nos dias 0, 21 e 30 do experimento. A via escolhida foi a intraperitoneal, e o sangue dos animais foi coletado como descrito no item 3.17.1. Foram imunizados 5 animais por grupo, e as sangrias realizadas 7 dias após a segunda e terceira doses.

3.17.3.2- Imunização com bactéria inativada por calor

As linhagens utilizadas neste experimento foram inativadas por calor (65°C, 20 minutos) e as células preparadas como descrito no item 3.17.2.2. Grupos de 4 camundongos foram inoculados com 10^8 bactérias/ 200 μ l, em solução salina. Foram aplicadas 3 doses (0, 21 e 30 dias) via intraperitoneal. A coleta do sangue foi feita 7 dias após a segunda e terceira dose.

3.17.3.3- Imunizações com proteína purificada

A flagelina purificada de algumas das linhagens de *Salmonella*, portadoras dos plasmídios com o gene de flagelina recombinante, foi inoculada em camundongos. As proteínas empregadas na imunização dos animais tiveram seu pH ajustado ao redor de 7,0 com hidróxido de sódio, antes da mistura com o adjuvante. Empregamos cerca de 10 μ g de proteína purificada por animal. A preparação do inóculo foi feita adsorvendo a

proteína com 500 µg de hidróxido de alumínio (em forma de gel), em volume final de 200 µl (ajustado com solução salina). Empregamos 3 doses, via intraperitoneal, sendo o intervalo entre elas, em relação à primeira, de 21 e 35 dias, respectivamente. Foram imunizados 5 animais para cada controle e 6 animais com as diversas construções obtidas.

O sangue coletado e a preparação do soro foram realizadas como mencionado no item 3.17.1. Foram feitas sangrias nos dias 29 e 42, após a primeira dose.

3.17.4- Teste de persistência das linhagens de *Salmonella* nos camundongos

Grupos de 15 animais foram inoculados intraperitonealmente com linhagens de bactérias preparadas, como descrito anteriormente (item 3.17.2.1), com dose de 5×10^6 bactérias, via intraperitoneal. Nos dias 3, 10, 15, 21 e 35 do experimento, grupos de 3 animais imunizados com cada linhagem foram sacrificados e seus fígados e baços retirados assepticamente, para verificação da presença de bactérias.

O fígado e baço foram macerados separadamente e homogeneizados em solução salina em 10 ml finais (considerada diluição 1:10). Aliquotas de 100 µl foram distribuídas, em triplicata, em placas de meio LB, LB/ampicilina e MacConkey, para verificação de possíveis contaminantes. As colônias obtidas foram contadas após crescimento por cerca de 16 a 20 horas, a 37°C.

3.17.5- Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos

3.17.5.1- Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos contra a flagelina

- **Ligação do antígeno à placa** - empregamos por poço, 100 ng de flagelina em 50µl de tampão carbonato pH 9,6 (tampão de cobertura descrito no item 3.5.8). A placa foi incubada a 4°C durante a noite.

- **Bloqueio de sítios inespecíficos**- depois de lavar a placa 3 vezes com solução de lavagem, os sítios inespecíficos de união dos anticorpos foram bloqueados por adição de 100 µl de solução bloqueadora (PBS e 1% de gelatina), e a placa incubada por 1 hora, a 37°C.

- **Adição dos soros dos camundongos imunizados**- após um ciclo de lavagens (como o anterior), foram feitas diluições seriadas dos soros coletados dos camundongos imunizados com *Salmonella*, carregando as diferentes construções a serem testadas.

As diluições foram feitas, geralmente, a partir de 1:100 (em alguns casos utilizamos uma diluição maior) em solução bloqueadora com 0,05% de Tween 20. Nessa etapa, a placa é incubada a 37°C, por 1 hora, recoberta com Parafilme, para manter uma atmosfera úmida. Esse período é seguido por 4 lavagens com a solução de lavagem.

- **Adição do anticorpo conjugado à peroxidase** - o anticorpo conjugado à peroxidase foi adicionado em 50 µl/poço, em solução bloqueadora. A diluição do anticorpo geralmente foi 1:3000 (Sigma). Depois de incubação por 1 hora a 37°C, em

atmosfera úmida, foram feitas 3 lavagens com PBS mais Tween e apenas uma com PBS. O anticorpo empregado foi anti-IgG de camundongo.

- **Revelação** - colocou-se 50 µl/poço da solução reveladora em tampão citrato. Previamente ao uso, dilui-se 20 mg de OPD e 8 µl de H₂O₂ (solução estoque: 30%) no tampão citrato. Após incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro, a reação é interrompida com a adição de 50 µl por poço de uma solução 1 M de ácido sulfúrico. A leitura da densidade óptica foi realizada a 492 nm, em leitor de placa (Multiscan MS- Labsystems).

3.17.5.2- Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos contra o peptídeo SM5

- **Ligação do antígeno à placa**- as placas utilizadas nesse procedimento foram Nunc, referência 269787. A cobertura da placa foi feita com 1,0 µg de peptídeo por poço, em 100 µl tampão carbonato, pH 9,2. A placa foi colocada a 4°C, durante a noite. Após esse período, a placa foi lavada 3 vezes somente com PBS.

- **Bloqueio dos sítios inespecíficos**- o bloqueio foi feito pela adição de 200 µl/poço de solução bloqueadora com gelatina, seguido de incubação de 1 hora, a 37°C, em atmosfera úmida.

- **Adição dos soros dos camundongos** - após 3 lavagens com solução de lavagem, foi feita a diluição seriada dos soros, iniciando-se com a diluição 1:50, em PBS/gelatina, com 0,05% Tween. A placa foi incubada 37°C, por 1 hora, em atmosfera úmida. Antes da adição do conjugado, a placa foi lavada por 4 vezes.

- **Adição do anticorpo conjugado à peroxidase**- o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (dil. 1:2000) foi adicionado (100 µl/ poço) em PBS/gelatina e, a seguir, a placa foi incubada por 1 hora, a 37°C. Após esse período, a placa foi lavada por 6 vezes, deixando-se a solução da última vez permanecer por 1 a 2 minutos nos poços.

-**Revelação** - procede-se da mesma forma que no ELISA contra flagelina (item 3.17.5.1), entretanto foram empregados 100 µl de solução reveladora por poço. Para inativar a reação, utilizou-se 100 µl de ácido sulfúrico 1 M.

3.17.5.3- Ensaio imunoenzimático contra bactéria total

- **Preparação das bactérias para cobertura da placa**- as linhagens empregadas para a cobertura da placa foram cultivadas a 37° C, com agitação, até DO 1,0 (600 nm). Em seguida, foi adicionada formalina (0,5%), prosseguindo-se a agitação por cerca de 16 horas. As células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS. A concentração final foi ajustada para DO 0,5 (600 nm). Dessa concentração final foram usados 100 µl por poço para a sensibilização da placa que foi incubada a 4°C, durante a noite. Foram utilizadas placas do mesmo tipo empregado no ELISA contra flagelina.

O bloqueio e os passos seguintes do ensaio foram exatamente iguais aos utilizados no ELISA contra flagelina (item 3.17.5.1). O anticorpo primário utilizado foi contra a flagelina (Difco) numa única diluição (1:1000). O anticorpo secundário empregado foi anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Difco), na concentração 1:3000.

3.18- MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A cultura de bactérias foi aplicada sobre telas de cobre para microscopia eletrônica, recobertas com película de formivar e de carbono. A diluição da suspensão foi acertada para se obter uma dispersão ótima das bactérias sobre a película.

Em seguida, foi feito o contraste negativo com solução de ácido fosfotúngstico 2%, neutralizada com KOH. As telas foram examinadas e eletromicrografadas no microscópio eletrônico Phillips, do laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz.

4- RESULTADOS

4.1- INSERÇÃO DA SEQUÊNCIA DO EPITOPO HETERÓLOGO NO GENE DA FLAGELINA

Conforme exposto na Introdução, genes de flagelina podem ser divididos em oito regiões, de acordo com a homologia de bases entre diferentes sorotipos. Os plasmídios descritos a seguir resultam da inserção de oligonucleotídeo que codifica um epítopo da proteína M de *Streptococcus pyogenes* (oligo-M), em três diferentes regiões do gene da flagelina (III, VI, VIII). As construções nas regiões III e VI foram feitas através de um adaptador, contendo três sítios de restrição, *Xho* I, *Cla* I, *Sma* I (adaptador XCS), que permite a correção da fase de leitura para qualquer oligonucleotídeo introduzido.

4.1.1- Inserção na região III

A inserção na região III foi feita utilizando-se o sítio *Hind* III presente no gene da flagelina. Como pode ser visualizado na Figura 7, o vetor pLS408, que possui dois sítios de *Hind* III, sendo um no gene de flagelina e outro na região do MCS, foi parcialmente digerido por *Hind* III, em seguida por *Sma* I e religado, após preenchimento das extremidades coesivas por DNA polimerase (Klenow). Tal estratégia originou o vetor pLS503, contendo um sítio único de *Hind* III na posição 526 do gene de flagelina. Esse sítio foi usado para ligação subsequente do adaptador XCS. A mistura de ligação foi introduzida por eletroporação na linhagem JM101. Diversos clones foram analisados por restrição e sequenciados; um vetor contendo o adaptador na orientação correta em cópia única (Figura 8A) foi denominado pRG3.

Para a inserção do oligonucleotídeo especificando o epitopo da proteína M na fase de leitura apropriada, utilizou-se o vetor pRG3, digerido com a enzima *Cla* I (sensível à metilação), e tratado por Klenow. Para tanto, o vetor foi purificado a partir da linhagem JM110, que é deficiente nos sistemas de metilação (*dam/dcm*), permitindo digestão total por essa enzima (Sambrook *et al.*, 1989).

A ligação do oligo-M ao vetor pRG3 foi feita com T4 DNA ligase e a mistura de ligação introduzida por eletroporação na linhagem JM101. Os clones obtidos foram analisados por restrição com a enzima *Kpn* I, a qual, no vetor parental, origina fragmentos de, aproximadamente, 4.500 e 1.500 pb. Recombinantes contendo o oligo-M apresentam fragmentos de 3.540 pb, 1.500 pb e 960 pb, como pode ser visualizado na Figura 9A (canaletas 6 e 16). A determinação do número de cópias do inserto e a confirmação da fase de leitura foram feitos por seqüenciamento (figura 9B). O vetor obtido foi denominado pRG3M.

4.1.2- Inserção na região VI

Para inserção do oligonucleotídeo que codifica o epitopo heterólogo na região VI (Figura 10), utilizou-se o sítio de restrição *Nde* I, presente na posição 1.046 do gene. O plasmídeo parental, pLS503, possui um sítio adicional para tal enzima, na posição 183 do vetor de clonagem empregado (pUC19). Utilizando digestão parcial com *Nde* I, o vetor foi linearizado e o DNA submetido à eletroforese em agarose para separação dos fragmentos originados da digestão. Após eletroeluição da fração correspondente ao vetor linearizado, o DNA foi tratado com Klenow para preenchimento das extremidades coesivas.

O adaptador XCS foi ligado ao DNA e a mistura de ligação introduzida por eletroporação em JM101. Plasmídios foram analisados por restrição com *Xho* I e *EcoR* V,

de forma a permitir a localização do adaptador no gene. A confirmação da localização, o número de cópias e a orientação do adaptador foram verificados por seqüenciamento. Entre os analisados, um clone com o inserto em cópia única e na orientação correta (Figura 8B) foi denominado pRG6.

Para ligação do oligo-M, digeriu-se o vetor pRG6 com *Xho* I e *Sma* I e preencheram-se as extremidades coesivas com Klenow. A presença do inserto foi confirmada por digestão com a enzima *Kpn* I, que gera um fragmento de 420 pb inexistente no vetor parental (Figura 11A, canaleta 11). A confirmação da seqüência foi feita por seqüenciamento do DNA e o vetor obtido foi denominado pRG6M (Figura 11B).

4.1.3- Inserção na região VIII

Para a inserção nessa região, utilizamos o sítio de *Sty* I (único no vetor pLS408), na posição 1.286 do gene da flagelina. Sintetizou-se um par de oligonucleotídeos especificando o epitopo desejado (oligo-Ms), contendo extremidades compatíveis com o sítio *Sty* I, que permitiu ligação direta ao vetor, sem necessidade do uso de adaptador (Figura 5B).

O oligo-Ms foi ligado ao vetor pLS408, digerido com *Sty* I, e a mistura de ligação foi utilizada para transformar JM101 por eletroporação. Alguns recombinantes obtidos foram analisados por restrição com *Kpn* I. Uma banda de aproximadamente, 200 pb pode ser vista nos clones positivos (Figura 12, canaletas 10 e 12; a banda da canaleta 14 não está visível na foto). A confirmação da seqüência correta foi feita por seqüenciamento e o vetor obtido foi denominado pRG8M.

4.1.4- Inserção de dois epitopos na flagelina

Uma sequência extra correspondente ao peptídeo foi inserida na região hipervariável (região IV) dos vetores pRG3M e pRG6M, plasmídios com o oligo-M presente em outras regiões. A inserção na região IV pode ser feita utilizando-se o sítio *EcoR* V, único no vetor pLS408 e derivados. A abertura do vetor com essa enzima permite a inserção direta de qualquer sequência com extremidades abruptas, que tenha número de bases múltiplas de três, mantendo a fase de leitura do gene. Essas novas construções exploram a capacidade da flagelina suportar modificações, no caso, inserção de bases, e ainda manter a funcionalidade. Também são interessantes para verificação do efeito do número de cópias de um peptídeo heterólogo na resposta imune.

4.1.4.1- Inserção nas regiões IV e VI

Essa construção foi iniciada a partir do vetor pRG6M que já possui um oligo-M na região VI. A ligação do segundo oligo-M foi feita na região IV, empregando-se o sítio *EcoR* V, mencionado anteriormente. A mistura de ligação foi utilizada para transformar a linhagem JM101, e os recombinantes obtidos foram analisados por restrição. Doze clones foram digeridos com a enzima *Kpn* I, e entre eles obtivemos alguns com o padrão esperado para a presença dos dois insertos, pelo aparecimento de uma banda de 366 pb, como pode ser visto na Figura 13. O sequenciamento foi utilizado para confirmação da orientação do novo oligo-M, e o clone correto foi denominado pDP6M.

4.1.4.2- Inserção nas regiões III e IV

Foi realizada uma segunda construção com duas seqüências do epitopo heterólogo. O plasmídio empregado foi o pRG3M, com o primeiro inserto na região III e o sítio de *EcoR* V (na região IV), utilizado para a ligação do segundo oligo-M. A ligação foi realizada com T4 DNA ligase, e o DNA da ligação usado para transformar JM101. Alguns transformantes obtidos tiveram o DNA do plasmídio digerido por *Kpn* I; os clones positivos apresentaram uma banda de aproximadamente 100 pb, como pode ser visto na Figura 14. A orientação do novo inserto foi confirmada por seqüenciamento, e o clone correto foi denominado pDP3M.

4.1.5- Transferência dos plasmídios para *Salmonella*

Todos os plasmídios obtidos com a inserção da seqüência do epitopo da proteína M foram introduzidos na linhagem atenuada de *Salmonella* Dublin, SL5928, empregando-se eletroporação. A eletroporação de *Salmonella* pode ser feita diretamente com DNA de plasmídios retirados de *E. coli* devido à alta eficiência do sistema.

Na Tabela 1 estão citados os plasmídios obtidos, cuja descrição foi feita anteriormente, e as linhagens de *Salmonella* originadas após transformação da linhagem SL5928. Uma segunda linhagem de *Salmonella*, utilizando o vetor pRG8M, foi derivada da ICB5, que possui o gene da flagelina integrado no cromossomo (item 3.1.2).

TABELA 1- Linhagens de *Salmonella* atenuadas e plasmídios

Linhagens	Plasmídio
ICB7	pRG3M / SL5928; oligo-M na região III
ICB8	pRG6M / SL5928; oligo-M na região VI
ICB9	pRG8M / SL5928; oligo-M na região VIII
ICB10	pDP6M / SL5928; oligo-M nas regiões VI e IV
ICB11	pRG8M / ICB5; oligo-M na região VIII no gene <i>fliC</i> do plasmídio; gene <i>fliC</i> cromossômico funcional
ICB12	pDP3M / SL5928; oligo-M nas regiões III e IV

4.2- EXPRESSÃO DA FLAGELINA RECOMBINANTE NAS DIFERENTES LINHAGENS DE *SALMONELLA*

O primeiro teste realizado para detecção de flagelos funcionais ou, parcialmente funcionais, produzidos pelas linhagens citadas na Tabela 1, foi a verificação de motilidade em meio semi-sólido ou líquido, com utilização de microscópio óptico. A produção de flagelina foi confirmada através de imunoblot, onde as amostras foram preparadas a partir de um lisado total das bactérias.

4.2.1- Testes de motilidade

Flagelos normalmente impulsionam a bactéria ao longo de um gradiente quimiostático, uma função que pode ser observada através de ensaio de motilidade em meio semi-sólido. Neste trabalho, foi utilizado o meio com gelatina. Esse meio é transparente e permite a fácil visualização do crescimento das bactérias pelo seu interior, a partir da região do inóculo.

A linhagem SL5928 foi usada como controle negativo; o crescimento bacteriano fica restrito ao local perfurado pela agulha de platina. Como controles positivos, foram empregadas as linhagens SL5930 e ICB5, que se espalham por todo volume do meio.

A linhagem ICB9 não apresentou motilidade. Esse resultado é compatível com observações de que modificações nessa região, mesmo que pequenas, são suficientes para abolir a motilidade da bactéria (Homma *et al.*, 1987; Kuwajima *et al.*, 1989). Por outro lado, a linhagem ICB11, que possui o mesmo plasmídio que a ICB9, mas tem um gene de flagelina integrado no cromossomo, apresenta motilidade reduzida quando comparada com o controle ICB5; ela migra, aproximadamente, a metade da distância do controle. Esse dado demonstra que a flagelina híbrida está interferindo com a função da proteína funcional, e isso tanto pode ocorrer por competir com o sistema de exportação da flagelina, reduzindo a eficiência, como por sua incorporação no flagelo, afetando a função do mesmo.

As linhagens ICB10 e ICB12 (ambas com duas inserções) espalham-se pouco, e ficam bem próximas do inóculo inicial, onde se pode notar o crescimento por volta de 0,5 cm ao redor do inóculo. A ICB7 (região III) migra cerca de 1,5 cm no meio. Já a linhagem ICB8, com inserto na região VI migra, aproximadamente, a metade da SL5930 ou pouco mais (cerca de 3,0 cm). Isso demonstra que essa região é capaz de suportar modificações provocadas pela inserção do epitopo, sem ter sido feita nenhuma deleção anterior.

4.2.2- Bloqueio da motilidade com anticorpos

O método descrito no MM, item 3.16, descreve um teste simples, utilizando anticorpo contra a flagelina ou epitopo, para detecção rápida da produção de flagelina híbrida. Quando as linhagens foram observadas em meio líquido, ao microscópio, e com adição de anti-d (anticorpo contra flagelina), a motilidade apresentada por elas foi bloqueada ou diminuída. Algumas delas chegaram a formar grumos devido à forte reação ocorrida.

As linhagens utilizadas como controle positivo para motilidade, SL5930 e ICB5, apresentaram bloqueio no movimento e reação de aglutinação com anti-d, e nenhuma reação com anti-M [(anticorpo contra o peptídeo SM5(1-15)]. O controle positivo para o epitopo, linhagem SL7127, mostrou o mesmo comportamento que os controles positivos para anti-d e, também, foi observada a redução da motilidade quando adicionado anti-M à cultura.

A linhagem ICB9, como citado anteriormente, não apresentou motilidade em semi-sólido, e nenhuma reação de aglutinação pôde ser percebida empregando-se anticorpo anti-d. Esse resultado foi um forte indício que o filamento, mesmo não funcional, poderia não estar presente na superfície da célula. A linhagem ICB11, com o mesmo plasmídeo, mas com o gene integrado no cromossomo, teve a motilidade bloqueada após a adição de anti-d. Não foi observada nenhuma reação com anti-M para ambas as linhagens.

As linhagens ICB10 e ICB12, com duas seqüências do oligo M, responderam de forma similar ao controle SL7127, reagindo com os dois anticorpos. Já as linhagens ICB7 e ICB8 apresentaram bloqueio de motilidade somente com anti-d. Provavelmente, *in vivo*, as regiões III, VI e VIII não devem estar expostas na superfície do filamento flagelar, o que impediria o reconhecimento do epitopo pelo anticorpo anti-M. Esse fato, porém, não inviabiliza essas construções como carregadoras de epitopos heterólogos, já que a estrutura flagelar pode ser processada pelas células apresentadoras

de antígenos antes de ser apresentada ao sistema imune e, dessa forma, ocorrer a exposição de epitopos dessa região. Os resultados de motilidade, tanto em semi-sólido, como o bloqueio com anticorpos, estão resumidos na Tabela 2.

TABELA 2: Motilidade das linhagens utilizadas no trabalho- resultados de motilidade em semi-sólido e bloqueio em meio líquido com anticorpo anti-d ou anti-M

Linhagens	Semi-sólido	Meio líquido+ anti-d	Meio líquido+ anti-SM5
SL5928	-	-	-
SL5930	+	+	-
SL7127	+	+	+
ICB5	+	+	-
ICB7(reg.III)	+	+	-
ICB8 (reg.VI)	+	+	-
ICB9 (reg.VIII)	-	-	-
ICB10 (reg.IV eVI)	+	+	+
ICB11 (reg.VIII)	+	+	-
ICB12 (reg. III eIV)	+	+	+

A motilidade foi verificada empregando-se o meio semi-sólido com gelatina; nessa parte do ensaio os sinais (+) e (-) indicam as linhagens com motilidade positiva e sem motilidade, respectivamente. A reação com anticorpo policlonal anti-d e anti-M foi observada através da mistura das linhagens crescidas em meio líquido com os anticorpos e observação ao microscópio óptico; os sinais (+) e (-) indicam a presença ou não de reação.

4.2.3- Detecção de proteína recombinante por “western-blot”

A técnica de “western-blot” (item 3.14, MM) foi empregada para verificação da presença de flagelina recombinante. Utilizando anticorpos anti-d e anti-M, ambos produzidos em coelho, pudemos constatar a produção de flagelina por todas as linhagens de *Salmonella* empregadas no trabalho.

Como pode ser visto na Figura 15A, todas as linhagens produziram flagelina reconhecida pelo anticorpo anti-d, com exceção da linhagem SL5928, sem flagelina. Em todas as canaletas aparecem bandas inespecíficas, as quais, quando comparadas, são um bom indicativo da quantidade de proteína total aplicada no gel; nesse caso, confirma-se que quantidades semelhantes de proteína foram usadas em todas as amostras.

A flagelina produzida pela SL5930 (canaleta 3, Figura 15A), sem inserto nenhum, tem um peso molecular de cerca de 51 kDa. As outras linhagens possuem bandas com tamanho maior, correspondendo à proteína com o epítipo inserido. A flagelina produzida pela linhagem ICB7 (inserto na região III), apesar de possuir somente um epítipo inserido, apresenta um perfil de migração um pouco diferente das outras proteínas nas mesmas condições (comparar, por exemplo, com a linhagem SL7127), ficando com um peso aparentemente mais alto. As linhagens com duas seqüências do epítipo, ICB10 e ICB12 (canaletas 8 e 6, respectivamente) têm tamanho visivelmente superior às outras flagelinas.

Pode-se, ainda, observar na Figura 15A, que a quantidade de flagelina acumulada nas células não é a mesma para todas as linhagens. Isso pode ocorrer, devido a modificações na estrutura da proteína causada pela inserção do epítipo, podendo gerar problemas de síntese ou exportação, levando ao acúmulo no citoplasma e posterior degradação, que pode ser observada em certo grau nas linhagens ICB9, ICB10, ICB11 e ICB12. A inserção do Oligo-M em determinados pontos da flagelina também poderia dificultar o reconhecimento pelo anticorpo contra a proteína híbrida, o que levaria a um sinal mais fraco, não significando porém, diferenças em quantidades de proteína. Brey e colaboradores, através da injeção de uma flagelina truncada logo após o sítio de *EcoR* V (devido à perda da fase de leitura por uma inserção incorreta), obtiveram um anticorpo capaz de reconhecer flagelinas híbridas, que não eram detectadas anteriormente em “western-blot”, por outros anticorpos contra a flagelina produzidos a partir da imunização com a proteína selvagem purificada ou uma linhagem flagelada (Stocker e Newton, 1994).

Na Figura 15B, pode ser visto o resultado empregando-se as mesmas amostras e anticorpo anti-M. As linhagens SL5928, SL5930 e ICB5 não possuem banda nenhuma correspondente à flagelina por não terem o epitopo heterólogo. O controle positivo, nesse caso, a SL7127 (inserto na região IV), e as demais linhagens, apresentaram uma banda correspondente à flagelina híbrida, mostrando que essas proteínas foram reconhecidas tanto pelo anti-M, quanto pelo anti-d.

As linhagens com a inserção do epitopo na região VIII apresentaram bandas menores, bem próximas em tamanho às da flagelina híbrida, reconhecidas tanto pelo anti-d como pelo anticorpo contra o peptídeo. Essas bandas podem ser resultado de degradação.

4.2.4- Detecção de flagelina em bactérias inteiras através de ELISA

Como foi demonstrado pelo “western-blot”, ocorre produção de proteína híbrida por todas as linhagens citadas na Tabela 1. Esses resultados, juntamente com os de motilidade em semi-sólido (Tabela 2), forneceram indícios de que uma produção diferencial de flagelos poderia estar ocorrendo. Uma forma simples para verificar esse fato foi obtida empregando-se um imunoenensaio com as diferentes linhagens de *Salmonella*, usadas como antígenos e anticorpo anti-d, para detecção da flagelina exposta na superfície das bactérias.

A mesma quantidade de bactérias de cada linhagem foi utilizada para a cobertura da placa de ELISA (item 3.17.5.3, MM). O anticorpo anti-d (diluição 1:500) foi empregado como anticorpo primário contra as diferentes linhagens, e o anticorpo secundário foi um anti-IgG de coelho, conjugado à peroxidase. Com esse teste pode-se obter uma comparação da quantidade relativa dos flagelos das linhagens empregadas

como controles e das linhagens obtidas com os novos plasmídios. Esses resultados estão representados na Figura 16.

As linhagens SL5930 e ICB5 forneceram os melhores resultados, refletindo uma maior quantidade de flagelina, estando de acordo com a motilidade observada, onde as duas linhagens apresentam melhor desempenho que as demais. Apesar de não possuir flagelo, a SL5928 apresenta alguma resposta. Isso pode ser devido à existência de outros anticorpos contra salmonela no anticorpo primário utilizado, por contaminação da preparação de flagelina empregada na inoculação de animais para a produção de anticorpos anti-d. A resposta obtida para as linhagens SL5928 e ICB9 é praticamente inexistente quando é empregado o anticorpo anti-d adsorvido com a linhagem SL5928; o restante das linhagens apresenta uma resposta semelhante ao obtido com anticorpo não adsorvido.

A linhagem ICB9 apresenta um resultado comparável ao da SL5928, portanto, esse fato sugere que a flagelina dessa linhagem não está sendo montada em filamentos. Esse resultado é fortalecido pelos dados de aglutinação com anticorpo contra a flagelina em meio líquido, não ocorrendo reação com essa linhagem. Para a linhagem ICB11, onde a motilidade foi restaurada, a quantidade de flagelina está próxima à das linhagens portadoras de inserto nas regiões III e VI do gene. Essas três últimas, teriam uma quantidade de flagelo intermediária entre os controles SL5930 e ICB5. O controle SL7127 e as duas linhagens com duplas inserções, todas com motilidade similar, mas reduzida em relação às outras linhagens com inserção nas outras posições, possuiriam menor quantidade de flagelina.

4.2.5- Microscopia eletrônica

Utilizando-se microscopia eletrônica, foram confirmadas algumas observações feitas anteriormente. Um dos resultados mais importantes foi a confirmação da ausência de flagelos da linhagem ICB9. Como pode ser visto na Figura 19A, essa linhagem não possui nenhum flagelo, e sua aparência é semelhante à do controle negativo, linhagem SL5928 (Figura 17A). Já a linhagem ICB11 (Figura 19B), que possui o mesmo plasmídeo que a anterior, mas com o gene de flagelina adicional no cromossomo, monta flagelos funcionais. Na Figura 17B pode ser vista a linhagem utilizada como controle para essa construção, a ICB5.

As outras linhagens, ICB7, ICB8 e ICB10 (figuras 20A, 20B e 21A, respectivamente) possuem flagelos com aspecto normal. A linhagem ICB8 possui, inclusive, quantidade semelhante aos controles SL5930 (Figura 18A) e SL7127 (Figura 18B), enquanto as outras duas, aparentemente, apresentam menor número que o controle. A linhagem ICB12 possui um número de flagelos próximo ao controle SL5930, mas com o tamanho muito menor que o usual, como pode ser visto na Figura 21B. A diminuição da motilidade, observada para as linhagens com flagelos híbridos e a forma do filamento, estruturalmente semelhante ao controle com flagelina selvagem, também foram obtidas em outros trabalhos (Verma *et al.*, 1995; Acero-Reyes, 1994).

4.3- ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE

4.3.1- Verificação da persistência bacteriana

A persistência bacteriana no fígado e baço foi outro parâmetro utilizado para comparação dos controles SL5930 e SL7127 com as linhagens portadoras do epitopo

inserido em outras regiões. Era necessário esclarecer se a modificação realizada na flagelina seria capaz de alterar o tempo de permanência das linhagens no tecido. Camundongos foram imunizados com uma única dose de cerca de 5×10^6 células com as linhagens controles SL5930 e SL7127 e duas novas, ICB8 e ICB10. O procedimento está descrito no item 3.17.4 do MM.

Os gráficos da Figura 22 mostram a variação obtida no número de colônias, entre o período de 3 a 35 dias, a partir de macerado do baço e fígado de camundongos inoculados com 5×10^6 (uma única dose), onde se pode observar a permanência das linhagens durante o tempo estudado. Os resultados mostram, para todas as linhagens, que ocorre a colonização dos dois órgãos estudados, e as bactérias permanecem nos tecidos num número próximo de 10^2 no 35º dia do experimento. Esses resultados sugerem que as mesmas observações poderão ser estendidas às outras construções, além dos valores resultantes serem próximos aos obtidos por Acero-Reyes (1994), O'Callaghan *et al.* (1988), Verma *et al.* (1995) e Khan *et al.* (1994). Os resultados não apresentaram diferença significativa, como foi observado através dos resultados do teste ANOVA ($p \leq 0,05$).

4.3.2- Propriedades imunogênicas- resposta humoral

O estudo da capacidade imunogênica foi verificado pela imunização de camundongos BALB/c, com idade variando de 10 a 16 semanas. Na maior parte dos experimentos, o sangue foi coletado após a segunda e terceira doses, sendo que a análise empregada no trabalho se refere aos soros obtidos após a terceira dose. Alguns soros obtidos após a segunda dose foram testados e, comparando-se com os da terceira dose, verificou-se que a resposta obtida era inferior. Foi decidido, portanto, analisar somente os soros obtidos após a última dose. Os soros dos animais foram preparados oito dias após cada inoculação, como descrito no item 3.17.1 do MM. Os soros obtidos foram analisados

individualmente, para a fração IgG, em diferentes diluições, contra flagelina e contra o peptídeo da proteína M, como descrito no item 3.17.4. Os resultados dessas imunizações estão relacionados adiante. Os dados estão expressos como títulos de anticorpos, representando a diluição mais alta do soro equivalente a duas vezes a DO_{492nm} do soro pré-imune, na diluição 1:100. Contra a flagelina todas as amostras foram analisadas ao menos duas vezes, e os desvios padrões não são superiores a 20%; para o peptídeo algumas amostras foram analisadas duas vezes.

4.3.2.1- Imunizações com bactérias vivas e inativadas

Como foi mencionado anteriormente, a quantidade de flagelina estimada é variável para todas as linhagens testadas, como observado a partir dos resultados de “western-blot”, ELISA com bactéria total e motilidade, sendo esse fato levado em consideração para a escolha das diferentes formas de imunização empregadas. A imunização com bactérias vivas foi o primeiro teste realizado; essa seria a forma desejada, já que empregamos um sistema com bactérias atenuadas. Na imunização com bactéria inativadas, que vem sendo empregada tradicionalmente como vacina, a utilização de um número maior de bactérias por dose poderia levar a uma melhor resposta. Wick *et al.* (1994) obtiveram uma resposta imune melhor contra o antígeno heterólogo, utilizando *Salmonella* inativada por calor, do que bactéria viva, provavelmente, devido a um processamento mais rápido da bactéria. Portanto, uma outra abordagem empregada para comparação das novas linhagens foi a utilização de bactérias inativadas por calor, onde se espera a produção de altos títulos de anticorpos.

Na imunização com as linhagens vivas foram empregados grupos de cinco camundongos, inoculados intraperitonealmente, com três doses de 5×10^6 bactérias, em 200 μ l de solução salina, aplicadas nos dias 0, 21 e 30. Os soros obtidos após a terceira dose foram submetidos ao imunoensaio; algumas amostras, por apresentarem títulos de

anticorpos muito elevados, foram repetidas isoladamente para verificação da diluição máxima que poderia ser alcançada.

No experimento com bactérias inativadas por calor, foram utilizados grupos com 4 animais imunizados com 10^8 bactérias. Durante o andamento do mesmo, houve perda de alguns animais, devido às reações adversas causadas por uma dose maior de bactérias. Nesse experimento também foram empregadas três doses, com o mesmo intervalo do experimento anterior. Nos dois experimentos, foi utilizada a via intraperitoneal.

Na Tabela 3, estão os títulos de anticorpos obtidos na terceira dose, contra flagelina e peptídeo, para os dois experimentos descritos anteriormente. Como mencionado, os resultados são individuais e cada linha corresponde ao resultado de um camundongo. Houve perda de dois camundongos do grupo ICB8 e um do grupo SL5930, do experimento com bactéria inativada e, no caso desses dois grupos, estão indicados os valores obtidos com o soro coletado após a segunda dose. Nas Figuras 23 e 24 podem ser vistos os mesmos resultados da Tabela 3, colocados em gráficos, evidenciando o valor médio obtido para cada grupo.

TABELA 3: Resposta humoral de camundongos imunizados com bactérias-vivas e bactérias inativadas, via intraperitoneal

Linhagens	Bactéria Viva		Bactéria Morta	
	Flag.	Pep.	Flag.	Pep.
SL5930	204.800*	- (a)	102.400	-
	51.200*	-	819.200*	-
	409.600*	-	25.600	-
	25.600*	-		
	12.800	-		
ICB5	204.800	-	102.400	-
	6.400	-	102.400	-
	6.400	-	102.400	-
	204.800	-	102.400	-
	25.600	-		
SL7127	12.800	200	6.400	1600
	25.600*	800	25.600	3200
	3.200	400	51.200	6400
	51.200*	-	25.600	6400
	1.600	-		
ICB7	3.200	-	102.400	-
	51.200	-	102.400	-
	12.800	200	102.400	-
	6.400	200	102.400	-
	12.800	-		
ICB 8	204.800*	-	25.600	200
	25.600	-	12.800	-
	25.600	-		200 ^b
	51.200	-		
	102.400	-		
ICB10	51.200	400	12.800	800
	12.800	800	25.600	800
	12.800	-	6.400	3200
	12.800	800	102.400	1600
	102.400	400		
ICB9	6.400	200	12.800	-
	12.800	-	25.600	-
	6.400	-	12.800	-
	6.400	-	51.200	-
	12.800	200		
ICB11	51.200	200	102.400	-
	3.200	200	6400	-
	51.200	-	6400	-
	25.600	-	102.400	-
	6.400	-		

TABELA 3- Resultados obtidos a partir de ELISAs, realizados com soro de camundongos imunizados com as linhagens vivas (três doses com 5×10^6 bactérias) ou inativadas por calor (três doses de 10^8), intraperitonealmente, contra os antígenos (fase sólida) flagelina purificada (Flag) e contra o peptídeo SM5 (1-15) (Pep), expressos de forma individual. Dados a partir de D.O 492 nm, já descontados os controles da placa (branco). (*) indica valores obtidos a partir de um único ensaio; (a) indica títulos de 50 ou 100, que seriam negativos (os mesmos valores obtidos para os controles sem peptídeo); (b) valor obtido com soro coletado após a segunda dose de antígeno.

Na Figura 25 podem ser vistos os gráficos com valores individuais da resposta humoral contra a flagelina, na diluição 1:400, para os dois experimentos em questão. Esses gráficos mostram o comportamento do grupo, através da dispersão em torno do valor médio obtido, onde se pode notar uma variação na resposta individual razoável, o que é comumente encontrado, principalmente na imunização com bactérias vivas.

4.3.2.2- Imunização com flagelina híbrida purificada

A imunização com flagelina purificada foi a forma encontrada para inoculação de uma mesma quantidade de antígeno, no caso, a flagelina híbrida com o epitopo heterólogo nas diferentes regiões. A preparação de flagelina híbrida a partir de linhagens com filamentos é razoavelmente simples; as que produzem somente a flagelina, mas perdem a capacidade de montar o filamento, têm o processo de purificação comprometido, tendo que passar por etapas adicionais para obtenção do mesmo produto. Devido a esse fato, nessa etapa do trabalho, a linhagem ICB9 não foi utilizada e a linhagem ICB11, apesar de apresentar filamentos, não foi testada por ter sido obtida posteriormente.

Foram empregadas flagelina purificada das linhagens controle, SL5930 e SL7127 (cinco animais por grupo) e flagelina das linhagens ICB7, ICB8 e ICB10 (seis animais por grupo). Foram inoculadas 10 µg de proteína (quantificada pelo método de Bradford) combinada com hidróxido de alumínio como adjuvante, em 200 µl finais, em três doses (0, 21 e 35 dias). Após a aplicação da primeira dose da proteína, alguns animais mostraram-se debilitados e, após a aplicação da segunda dose do antígeno ocorreu a morte de dois animais do grupo imunizado com flagelina da linhagem ICB8 e três do grupo da SL7127, provavelmente devido a uma contaminação da preparação de proteínas com LPS e, por esse motivo, foram empregados alguns resultados obtidos com os soros coletados após a segunda dose. Um grupo de três animais foi inoculado somente com o adjuvante, para verificação do efeito desse composto, que mostrou causar certa irritação nos animais, os quais se recuperavam cerca de três dias depois da inoculação. Os resultados obtidos com a análise dos soros coletados após a terceira dose estão na Tabela 4. Os títulos de anticorpos foram determinados por ensaio imunoenzimático, tanto para flagelina, como para o epitopo.

Como pode ser visto na Tabela 4, os títulos contra flagelina são extremamente altos para todos os grupos, havendo uma diminuição nos grupos ICB10 e ICB8. Essa variação poderia ser explicada por uma diferença na quantidade de antígeno; a preparação de flagelina apresentou contaminação com outras proteínas, provavelmente da membrana, interferindo na dose real de flagelina inoculada, que foi quantificada pelo método de Bradford. A observação posterior em gel de poliacrilamida mostrou pequena diferença entre as amostras (resultados não apresentados), mas não deve afetar acentuadamente os resultados da imunização. Na Figura 26, os gráficos mostram os mesmos resultados da Tabela 4, indicando porém, o valor médio obtido para cada grupo.

TABELA 4- Título de anticorpos obtidos a partir de imunização com flagelina purificada

Linhagens		Flagelina	Peptídeo
SL5930	1	$> 10^6$	-
	2	$> 10^6$	-
	3	$> 10^6$	-
	4	$> 10^6$	-
	5	$> 10^6$	-
SL7127	1	$> 10^6$	(800)
	2	$> 10^6$	(800)
	3	$> 10^6$	(3.200)
	4	nd	(800)
	5	nd	(800)
ICB7	1	$> 10^6$	-
	2	$> 10^6$	-
	3	$> 10^6$	200
	4	$> 10^6$	-
	5	$> 10^6$	-
	6	$> 10^6$	-
ICB8	1	819.200	200
	2	409.600	200
	3	819.200	200
	4	102.400	200
	5	nd	(200)
ICB10	1	25.600	200
	2	$> 10^6$	400
	3	819.200	400
	4	819.200	> 6.400
	5	204.800	1.600
	6	204.800	400

Resultados obtidos a partir da análise dos soros de camundongos (coletados após a terceira dose) imunizados com três doses de 10µg de flagelina purificada das linhagens discriminadas na tabela. O sinal (-) indica títulos iguais ou menores que 100; (nd) corresponde a títulos não determinados. Nos grupos SL7127 e ICB8, os dados entre parênteses são resultantes da análise do soro coletado após a segunda dose.

4.3.2.3- Imunização com bactéria viva- estudo das linhagens com dois epitopos

Para comprovar o efeito de duas inserções de epitopos no flagelo, foi feita mais uma construção, a da linhagem ICB12, portadora de um plasmídio com o gene da flagelina com duas seqüências do oligo M, uma na região IV e outra na região III. Essa linhagem foi utilizada somente em uma imunização, com a linhagem viva inoculada via intraperitoneal. A dose e o esquema de imunização foram os mesmos descritos no item 4.3.2.1. Na Tabela 5 podem ser vistos os títulos de anticorpos obtidos após a terceira dose.

TABELA 5: Título de anticorpos obtidos a partir de imunização com bactéria viva (via intraperitoneal)- comparação das linhagens com dois epitopos na flagelina

Animais	SL7127		ICB10		ICB12		SL5930	
	Flag	Pep	Flag	Pep	Flag	Pep	Flag	Pep
1	25.600	-	12.800	-	12.800	-	>102.400 ^a	- ^a
2	25.600	-	6.400	-	25.600	-		
3	12.800	-	800	-	6.400	-		
4	25.600	-	6.400	-	12.800	-		
5	12.800	400	6.400	200	25.600	-		
6	>25.600	-	3.200	-	6.400	-		
7	6400	-	6.400	200	6.400	-		
8	6400	-	6.400	200				
9	6400	200						

Resultados obtidos de soros coletados após três doses de 5×10^6 bactérias, via intraperitoneal, através de imunoensaio. O sinal (-) corresponde a títulos iguais ou menores que 100; (a) representa o valor obtido a partir da combinação dos soros dos animais do grupo SL5930.

FIGURA 1-Via da biossíntese de compostos aromáticos (reproduzido de Stocker, B. A. D., in Vaccine, 1988); pAB, ácido para-aminobenzóico; DHB, ácido 2,3 diidroxibenzóico.

FIGURA 2- Representação esquemática do gene *fliC(d)* de *Salmonella* Muenchen. Os segmentos I a VIII foram definidos por Wei & Joys (1985), de acordo com a extensão de homologia (indicada na figura) entre os diferentes genes de flagelina (*a*, *c*, *d*, *i*). O número abaixo dos blocos representa a média da percentagem de homologia para os quatro genes (as comparações foram feitas entre cada duas sequências)

FIGURA 3- Representação esquemática do vetor pLS408. O plasmídio é derivado do pUC19 (Newton *et al.*, 1989) pela inserção de um fragmento de *Salmonella* Muenchen contendo o gene *fliC*, com uma deleção *in vitro* de 48 pb. Existe um único sítio de *EcoRV* na região hipervariável, usado para a inserção de epitopos heterólogos nessa região.

FIGURA 4: O vetor pLS503 é derivado do pLS408 e possui sítio único de *Hind* III no gene da flagelina. Os sítios de *Sma* I a *Hind* III, do múltiplo sítio de clonagem do pUC19, foram deletados.

A

Gene M5 5'/-GCC GTG ACT AGG GGT ACA ATA AAT GAC CCG CAA AGA GCA AAA GAA-/3'

Prot. M5 Ala Val Thr Arg Gly Thr Ile Asn Asp Pro Gln Arg Ala Lys Glu

Inserto 5' - GCT GTT ACC CGT GGT ACC ATT AAT GAT CCG CAG CGT GCT AAA GAA CTA-3'

B

5' 3'

C TTG GCT GTT ACC GCT GGT ACC ATT AAT GAT CCG CAG CGT GCT AAA GAA CTA **GC**

CGA CAA TGG GCA CCA TGG TAA TTA CTA GGC GTC GCA CGA TTT CTT GAT **CGG AAC**

3' 5'

FIGURA 5- Em **A** está representada a sequência dos 15 aminoácidos da extremidade N-terminal da proteína M tipo 5 (prot. M5) e a sequência correspondente do gene clonado de *Streptococcus pyogenes* (gene M5) que pode ser comparada com a sequência empregada como **inserto** nas diversas construções realizadas. O sítio para *Kpn* I (sublinhado) foi incluído para facilitar a análise dos transformantes. O codon CTA (leu), em **negrito**, quando lido na orientação inversa, origina um codon de terminação, produzindo clones sem motilidade. Em **B** está a sequência do oligonucleotídeo (as duas fitas aneladas) que especifica o epítipo da proteína M usado na clonagem da região VIII. As bases em **negrito** foram acrescidas para ligação direta ao vetor digerido com *Sty* I, e as sublinhadas, para correção da fase de leitura.

A

5' CTCGAG ATCGAT CCCGGG 3'
 3' GAGCTC TAGCTA GGGCCC 5'
Xho I *Cla* I *Sma* I

B

Região III→ 5' CGGTGAAACTATTGA 3'
468

Região IV→ 5' ATACTATTAGACCCC 3'
605

Região VI→ 5' TTGATGGTGGCTATGCAGTG 3'
997

Região VIII→ 5' TTAAAGAGGTTAATACAG 3'
1232

FIGURA 6: Oligonucleotídeos e iniciadores utilizados no trabalho. Em **A** está a sequência dos oligonucleotídeos usados como adaptadores para a posterior inserção de uma segunda sequência (adaptador XCS). Os sítios das enzimas de restrição estão sublinhados. Em **B** encontram-se as sequências dos diferentes iniciadores que foram utilizados no sequenciamento de DNA dupla fita para cada região. O número abaixo deles indica a posição correspondente de anelamento da primeira base no gene *fliC*.

FIGURA 7- Estratégia utilizada para clonagem da sequência do epítipo da proteína M5, na região III do gene *fliC*.

A

(525)

5’/-CTT GAT **AAG CT** CTCGAG ATCGAT CCCGGG AG CTT AAT GTC CAG-/3’

B

(1049)

5’/- GCC GCT ACA CCCGGG ATCGAT CTCGAG TCG AGT GAT GAG-/3’

FIGURA 8: Em **A** está a sequência da região III, após a inserção do adaptador XCS no sítio de *Hind* III. Em **B** está representada a sequência da região VI, com o adaptador no sítio de *Nde* I. Nos dois casos, os sítios de restrição (em negrito) foram tratados com Klenow para posterior ligação do adaptador (sequência sublinhada).

B

(525)

5'/-AAG CTC TCG AGA TCG **GCT GTT ACC CGT GGT ACC ATT AAT GAT**
CCG CAG CGT GCT AAA GAA CTA CGA TCC CGG GAG CTT-/3'

FIGURA 9: A- análise de restrição de alguns dos plasmídios recombinantes obtidos a partir do vetor pRG3 com o inserto que especifica o epítipo da proteína M (fotografia do gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídeo). O DNA dos plasmídios extraídos de JM101 foi digerido com *Kpn* I e aplicado ao gel. Os clones das canaletas 6 e 16 apresentaram a banda de 960 pb, indicando a presença do inserto. Na canaleta 1 está o DNA de um dos clones não digerido. O marcador, 1Kb DNA Ladder (BRL), canaleta 17, tem os tamanhos das bandas utilizadas na análise dos fragmentos, indicadas na figura. O marcador completo é constituído pelas bandas de (bp): 12.216, 11.198, 10.180, 9.162, 8.144, 7.126, 6.108, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 506-517, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134 e 75. B- sequência da região do DNA do vetor pRG3M com o inserto. A sequência do epítipo está em negrito e a região do adaptador, para correção da fase de leitura, está sublinhada.

FIGURA 10- Estratégia utilizada para clonagem da sequência do epítipo da proteína M5 na região VI do gene *fliC*.

A

B

(1049)

5'/-ACA CCC **GCT GTT ACC CGT GGT ACC ATT AAT GAT CCG CAG CGT**
GCT AAA GAA CTA TCG AGT GAT GAG-/3'

FIGURA 11- A- análise de restrição de alguns dos plasmídios recombinantes obtidos a partir do vetor pRG6 com o inserto que especifica o epítipo da proteína M (fotografia do gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídeo). O DNA dos plasmídios extraídos de JM101 foi digerido com *Kpn* I e aplicado ao gel. O clone da canaleta 11 apresentou a banda de 422 pb, indicando a presença do inserto. Na canaleta 14 está o DNA de um dos clones não digeridos. Na canaleta 1, encontra-se o marcador de peso molecular, 1Kb DNA Ladder (BRL). O tamanho das bandas de maior interesse está indicado na figura (pb), as bandas restantes estão citadas na figura 9. **B-** sequência da região VI do DNA do vetor pRG6M. A sequência do epítipo está em negrito e a região do adaptador XSC, para correção da fase de leitura, está sublinhada.

FIGURA 12- Análise de restrição de alguns dos plasmídios recombinantes obtidos a partir do vetor pLS408, aberto no sítio de *StyI* (região VIII) e ligado à sequência que especifica o epítipo (fotografia do gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo). O DNA dos plasmídios extraídos de JM101 foi digerido com *Kpn I* e aplicado ao gel. Os clones das canaletas 10, 12 e 14 apresentaram uma banda de 230 pb demonstrando a presença do inserto. O marcador, 1Kb DNA Ladder (canaleta 1), tem os tamanhos de algumas bandas indicadas na figura (pb).

FIGURA 13- Análise de restrição de alguns dos plasmídios recombinantes obtidos a partir do vetor pRG6M, com o inserto que especifica o epitopo da proteína M, inserido também na região IV (fotografia do gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídeo). O DNA dos plasmídios extraídos de JM101 foi digerido com *Kpn I* e aplicado ao gel. Na canaleta 6 está o DNA do vetor pDP6M, clone que apresentou os dois insertos na orientação correta, posteriormente confirmado com o seqüenciamento. As duas bandas menores que 500 pb confirmam a presença dos insertos. Os clones das canaletas 2, 4 e 5 (bandas menores que 500 pb estão pouco visíveis) apresentam o mesmo padrão, porém, no clone 1, o inserto está invertido. Os outros não foram seqüenciados. Na canaleta 7 está o DNA de um dos clones não digerido. O marcador, 1Kb DNA Ladder (canaleta 1), tem os tamanhos de algumas bandas indicadas na figura (pb).

FIGURA 14- Análise de restrição de plasmídios recombinates obtidos a partir do vetor pRG3M, após adição de uma segunda seqüência que codifica o epitopo na região IV. O plasmídio dos clones recombinates foi digerido com *Kpn* I e os fragmentos separados em gel de agarose. A existência da banda de cerca de 100 pb (canaletas 2, 3, 4, 5) indica a presença dos dois epitopos no gene. Os clones positivos foram seqüenciados. O marcador de peso molecular (com o tamanho de algumas bandas indicadas na foto), o mesmo usado nas figuras anteriores, está na canaleta 1.

FIGURA 15: “Western blot” com anticorpos anti-d (**A**) e anti-M5 (**B**). As amostras separadas por SDS-PAGE são o extrato total das linhagens de *Salmonella*, com os vetores de interesse. A ordem das amostras, nas duas figuras, é a seguinte: **canaleta 2:** linhagem SL5928 (controle negativo); **3:** SL5930 (controle positivo); **4:** SL7127 (controle positivo para proteína M); **5:** ICB7; **6:** ICB12; **7:** ICB8; **8:** ICB10; **9:** ICB9; **10:** ICB11; **11:** ICB5. O padrão de proteínas, do tipo pré-corado (Gibco), na **canaleta 1**, está com algumas bandas indicadas nas figuras. O padrão completo é constituído por: miosina (200 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), BSA (68 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,3 kDa).

FIGURA 16- ELISA feito com a bactéria inteira como cobertura da placa. O anticorpo primário empregado foi contra a flagelina (anti-d, Difco) na diluição 1:500. O segundo anticorpo foi um anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase.

A

B

FIGURA 17- Microscopia eletrônica das linhagens SL5928 (A) e ICB5 (B). O aumento está indicado no canto direito de cada figura (também nas figuras 18, 19, 20 e 21)

A

B

FIGURA 18- Microscopia eletrônica das linhagens SL5930 (A) e SL7127 (B).

A

B

FIGURA 19- Microscopia eletrônica das linhagens ICB9 (A) e ICB11 (B).

A

16.800X

B

4.200X

FIGURA 20- Microscopia eletrônica das linhagens ICB7 (A) e ICB8 (B).

A

B

FIGURA 21- Microscopia eletrônica das linhagens ICB10 (A) e ICB12 (B).

FIGURA 22- Colonização do baço e fígado de camundongos BALB/c, após imunização intraperitoneal, com 5×10^6 bactérias vivas das linhagens SL5930, SL7127, ICB8 e ICB10. Cada valor é representado pela média do número de colônias presentes nos órgãos citados, de três camundongos sacrificados nos dias indicados, após a imunização.

FIGURA 23- Gráficos obtidos a partir dos títulos de anticorpos contra flagelina e peptídeo, após a análise do soro de animais imunizados com três doses de 5×10^6 bactérias vivas. Os mesmos dados foram utilizados na Tabela 3. A média dos valores está indicada pela barra horizontal.

FIGURA 24- Gráficos obtidos a partir dos títulos de anticorpos contra flagelina e peptídeo, após a análise do soro de animais imunizados com três doses de 10^8 bactérias inativadas. Os mesmos dados foram utilizados na Tabela 3. A média dos valores está indicada pela barra horizontal.

FIGURA 25- Resultados obtidos com imunização de camundongos BALB/c com linhagens vivas (5×10^6) ou inativadas (10^8), em três doses (0, 21 e 30 dias). Os soros, coletados depois da terceira dose, foram analisados por imunoensaio. Os resultados acima foram obtidos contra flagelina, com os soros diluídos 1:400. A média dos valores está assinalada pela barra horizontal.

FIGURA 26- Gráficos obtidos a partir dos títulos de anticorpos contra flagelina e peptídeo, após a análise do soro de animais imunizados com três doses de flagelina purificada. Os mesmos dados foram utilizados na Tabela 4. A média dos valores está indicada pela barra horizontal.

5- DISCUSSÃO

Conforme exposto na introdução, um dos métodos mais promissores para atenuação de *Salmonella* é a deleção de genes envolvidos na síntese de compostos aromáticos, uma vez que a auxotrofia gerada torna a bactéria dependente de substâncias que não são encontradas em concentrações suficientes no tecido de mamíferos. A eficácia e segurança de tais linhagens foram amplamente demonstradas em vários sistemas experimentais (Hoiseth & Stocker, 1981; Smith *et al.* 1983 e 1984; Robertsson *et al.*, 1983; Muukkur *et al.*, 1987), bem como em trabalhos de campo com seres humanos (Levine *et al.*, 1987; Levine *et al.*, 1989). De forma geral, imunização de camundongos com estes mutantes origina uma forte resposta local secretória, humoral e celular, e confere um alto nível de proteção contra o desafio com *Salmonella* Typhimurium patogênica.

A imunogenicidade de tais linhagens tem sido explorada no sentido de se obter vacinas híbridas; já que uma forte resposta imune é induzida em direção a componentes de *Salmonella*, a introdução de antígenos provenientes de outros patógenos pode, igualmente, gerar uma resposta imune potente e duradoura. De fato, inúmeros antígenos, das mais diversas origens, vêm sendo expressos em *Salmonella* e foram enumerados na introdução (para revisão, ver: European Comission COST/STD, 1996; Dougan, 1994).

Na grande maioria dos casos estudados, os antígenos simplesmente se acumulam intracelularmente, sendo liberados de forma inespecífica e amplamente desconhecida. Acredita-se que, em tais casos, o contato com o sistema imune seja iniciado somente através da lise da linhagem carregadora, e que a quantidade de antígeno presente na bactéria seja um fator fundamental na indução da resposta: quanto mais antígeno houver, mais forte a resposta gerada. No entanto, cumpre ressaltar que, de forma geral, a

super expressão de proteínas é deletéria para as células e, em se tratando de linhagens presentes no organismo, em condições certamente desfavoráveis, esse efeito deletério é ainda mais exacerbado, podendo se refletir em diminuição da imunogenicidade como um todo. De fato, em híbridos construídos a partir de proteína LamB, contendo epitopos do vírus HIV e expressos sob controle do promotor *tac* utilizando-se indução por IPTG a 10^{-3} M; não houve produção de anticorpos contra LamB ou contra o peptídeo inserido. Além disso, as linhagens sofriam lise parcial após indução *in vitro*. Todavia, diminuindo-se o nível de IPTG para 4×10^{-5} , detectou-se produção de anticorpos em cerca de 50% dos animais imunizados (S. Newton, comunicação pessoal).

Embora a secreção ou expressão do antígeno heterólogo na superfície bacteriana não sejam requisitos absolutamente necessários para obtenção de resposta imune, essas formas de apresentação têm algumas vantagens. Primeiro, evitando-se o acúmulo intracelular de altos níveis de antígeno, o efeito negativo sobre a linhagem carregadora deve diminuir. Segundo, epitopos de proteínas de membrana externa devem ser apresentados mais eficientemente se presentes na superfície celular, similarmente à forma nativa. Finalmente, a associação de antígenos heterólogos sobre a superfície ou secretados da célula deve prolongar e aumentar seu contato com o sistema imune (European Commission COST/STD, 1996). De fato, a maioria dos antígenos imunodominantes em bactérias são expostos na superfície.

À medida que se acumulam conhecimentos sobre antígenos protetores de patógenos em geral, torna-se possível reconhecer seqüências importantes para o desencadeamento de respostas imunes específicas, na forma de epitopos selecionados. A utilização de epitopos é particularmente importante quando a administração de um antígeno inteiro, seja como proteína purificada ou em sistemas de expressão heteróloga, desencadeia reações indesejadas. Um exemplo típico é o caso da proteína M de *Streptococcus*, principal fator de virulência desse grupo, que possui epitopos responsáveis por reações cruzadas com tecidos humanos. Uma das estratégias empregadas vem sendo a combinação, por técnicas de biologia molecular, de seqüências de epitopos da proteína

que estimulam somente uma resposta protetora, através da formação de anticorpos opsonizantes. Além disso, também estão sendo associados epitopos de diferentes linhagens para produção de uma resposta múltipla contra todas as linhagens (Dale *et al.*, 1996).

Um dos sistemas desenvolvidos para expressão de epitopos na superfície bacteriana emprega a proteína flagelina, constituinte do filamento flagelar, como carregadora de epitopos heterólogos (Newton *et al.*, 1989). A flagelina quimérica, contendo o epitopo, está presente em múltiplas cópias como parte do filamento flagelar, e os epitopos, quando inseridos na região hipervariável, estão acessíveis na superfície do filamento. Como cada filamento consiste de vários milhares de subunidades de flagelina e cada bactéria tem de três a dez flagelos, uma bactéria individualmente pode carregar até cem mil cópias de um epitopo. Em consequência, a replicação dos organismos, que continuam a produzir flagelos dentro do compartimento endossômico de APCs, pode prover substanciais quantidades de flagelina quimérica para processamento e apresentação de antígenos (Verma *et al.*, 1995a).

A flagelina tem a capacidade de suportar a inserção de uma seqüência de aminoácidos de diferentes tamanhos, sem afetar a sua função ou, como já observado em trabalhos anteriores, ainda que ocorra a perda da função flagelar é possível gerar uma resposta humoral e celular ao epitopo inserido. Contudo, um dos pontos limitantes na utilização desse sistema é o tamanho do inserto a ser acomodado na proteína, ficando restrito a algumas dezenas de aminoácidos.

A utilização de epitopos também é interessante no caso de microrganismos que apresentam mudanças rápidas em antígenos de superfície, como alguns vírus e parasitas. Neste caso, podem ser empregados epitopos estimuladores de células B, T ou, preferencialmente, epitopos B e T associados, uma vez que, em infecções naturais, ambos os tipos de epitopos estão presentes (Roitt, 1994). A utilização de epitopos pode ser suficiente para indução de uma resposta imune efetiva. Um exemplo disso é o trabalho que vem sendo desenvolvido pelo grupo de Ruth Arnon (McEwen *et al.*, 1992; Levi &

Arnon, 1995; Levi & Arnon, 1996) com um modelo de vacina sintética recombinante para influenza. Empregando um epitopo de hemaglutinina (responsável por anticorpos neutralizantes), dois epitopos de nucleoproteína (ativadores de células T citotóxicas) e o sistema de expressão em flagelina, foram obtidas diversas linhagens de *S. Dublin* atenuadas, com flagelina híbrida. Estudos de proteção em camundongos foram realizados com flagelina híbrida purificada, utilizando cada tipo isoladamente ou combinando-se a flagelina com os diferentes epitopos. Após imunização via nasal, foi observada imunidade sistêmica e local, resultando em proteção efetiva contra influenza (inclusive contra diferentes linhagens) e por longa duração. Essas propriedades da flagelina podem, também, ser atribuídas à existência de epitopos naturais de célula T, o que deve levar a uma indução desse tipo de resposta (Levi & Arnon, 1996).

A flagelina já foi empregada como carregadora de diversos epitopos, entre eles o epitopo CTP3, composto pelos resíduos 50 a 64 (Newton *et al.*, 1989); epitopo CTP1, também da subunidade B da toxina colérica, resíduos 8 a 20 (Acero-Reys, 1994); peptídeos S (122-137), pré-S₂ (120-145) do antígeno da superfície HBsAg de hepatite (Wu *et al.*, 1991); epitopo de 15 resíduos da extremidade amino-terminal da proteína M tipo 5 de *Streptococcus pyogenes* (Newton *et al.*, 1991); epitopo da gp160 (resíduos 735-742) de HIV (Newton *et al.*, 1995); diversos epitopos de influenza, tanto de hemaglutinina, quanto de nucleoproteína (McEwen *et al.*, 1992; Levi & Arnon, 1995; Levi & Arnon, 1996); epitopos de várias proteínas como CS de *Plasmodium*, proteínas VP4 e VP7 de rotavírus, proteína CRM197 de *Corynebacterium diphtheriae* e proteína de membrana externa de *N. meningitidis*, que têm sido expressos também na flagelina pelo grupo do Dr. Robert Brey (Brey *et al.*, 1991); epitopo MCC 88-103 do citocromo de mariposa, que vem sendo utilizado especificamente para o estudo da resposta celular (Verma *et al.*, 1995a) e epitopos da proteína listeriolisina (aminoácidos 215-226 e 91-99) de *Listeria* (Verma *et al.*, 1995b).

Em todos os trabalhos mencionados anteriormente foram detectados anticorpos contra a flagelina e epitopo nela inserido. O primeiro trabalho que descreveu

proteção empregando o sistema flagelina utilizou o epitopo de proteína M citado anteriormente (Newton *et al.*, 1991). O trabalho com epitopos de influenza também tem apresentado resultados positivos. O grupo de Ruth Arnon, como descrito anteriormente, vem usando flagelina híbrida purificada, carregando diferentes epitopos, tanto de células B, quanto T, e vem obtendo bons resultados de proteção, verificando resposta celular, humoral e secretória, além de conseguir um efeito cruzado para diferentes sorotipos do vírus de influenza (Levi & Arnon, 1996).

A inserção de epitopos heterólogos em regiões diferentes da central hipervariável é uma estratégia que pode ser empregada para otimizar o sistema, possibilitando, por exemplo, a inserção de um mesmo epitopo em dois sítios diferentes da proteína, ou a inserção de múltiplos epitopos numa molécula recombinante.

Dados na literatura sobre a inserção de epitopos em outra região diferente da central hipervariável, além da utilizada com o vetor pLS408 com inserção de epitopos na região dos aminoácidos 207-221, são muito recentes. He e colaboradores (1993) construíram uma série de vetores com o gene de flagelina, com deleções de tamanhos diferentes, usando a região dos aminoácidos 224 a 237, que é a outra região com determinantes antigênicos da região IV. Eles mostraram que flagelina com deleções de até 92 resíduos ainda é funcional. Foram inseridas duas seqüências de um epitopo de hepatite B no novo sítio da região IV, observando-se motilidade das células. Essa mesma construção na região IV, feita anteriormente, aboliu o movimento flagelar (Wu *et al.*, 1989). Aparentemente, o funcionamento da flagelina híbrida depende não somente das seqüências inseridas, mas também, da posição da inserção, uma vez que o mesmo epitopo, inserido em posições diferentes, causa efeitos diametralmente opostos na função flagelar.

Baseados no trabalho de Wey e Joys (1985) e, posteriormente, em Joys & Schödel (1991), foram iniciadas diversas clonagens, visando a obtenção de vetores com a seqüência de um epitopo heterólogo inserida em outras regiões do gene da flagelina. Para isso, foi empregado o vetor pLS408 e o epitopo correspondente aos quinze aminoácidos da extremidade amino terminal da proteína M tipo 5 de *Streptococcus pyogenes* (Oligo

M), utilizado anteriormente para inserção na região IV (Newton *et al.*, 1991). Com o objetivo de conseguir vetores que pudessem facilmente receber diferentes seqüências para epitopos heterólogos, optou-se pela utilização de adaptadores com três sítios de enzima de restrição (adaptador XCS), inseridos nos pontos onde foram feitas as clonagens. A inserção da seqüência do epitopo escolhido foi realizada após digestão do adaptador com uma ou duas enzimas (dependendo de cada caso) e correção das extremidades com Klenow, quando necessário. Todo DNA manipulado teve sua seqüência verificada através de seqüenciamento do DNA.

A primeira região empregada para a inserção do oligo M foi a região VI, segunda com maior variabilidade. Devido à variabilidade da região, previmos que a inserção de um epitopo heterólogo seria aceita pela proteína, sem prejuízos da função flagelar e, possivelmente, resultaria em exposição na superfície do filamento. Nossa previsão baseou-se não apenas no nível de variabilidade, mas no fato da divisão da molécula da flagelina em regiões fundamentais para montagem, localizadas nas extremidades (e altamente conservadas) e regiões variáveis antigenicamente ativas, concordar com modelos tridimensionais propostos para a organização do filamento flagelar. Em tais modelos, os domínios conservados encontram-se alinhados internamente ao filamento, próximos à cavidade central, enquanto os domínios variáveis se acham dispostos em regiões que se projetam externamente à superfície do filamento (Vonderviszt *et al.*, 1990).

A inserção na região III é interessante por ser um trecho razoavelmente conservado (homologia de cerca de 77%, em relação às outras flagelinas estudadas) e próximo a uma região que apresenta epitopos para célula T, próprios da flagelina (Joys & Street, 1993). Modificações nessa região poderiam ser responsáveis por abolir a montagem de filamentos, e ainda, permitir a exportação da proteína híbrida sintetizada, já que mutantes produtores de uma flagelina com 238 resíduos da extremidade amino-terminal formam uma proteína que pode ser exportada tão eficientemente, quanto a proteína selvagem (Kuwajima *et al.*, 1989).

Mutações na região VIII, extremamente conservada, possivelmente originariam proteínas com problema no transporte das subunidades, ou defectivas na polimerização, como observado em trabalhos com genes de flagelina com mutações nas extremidades amino e carboxi-terminais (Kuwajima *et al.*, 1989; Homma *et al.*, 1987). Para evitar maiores manipulações nessa região, optou-se pela inserção de um oligonucleotídeo, especificando o epitopo de interesse, acrescido de algumas bases para correção imediata da fase de leitura.

A inserção de dois epitopos heterólogos, em duas regiões diferentes da flagelina, foi resultante das primeiras observações obtidas com as construções das regiões VI e III, que retiveram a motilidade e, portanto, a capacidade de montar filamentos. Além disso, a combinação de dois insertos na mesma molécula permitiria um aumento da quantidade do epitopo heterólogo apresentado ao sistema imune, que tem sido apontado como um dos principais fatores a influenciar a eficiência do processamento de antígenos (Wick *et al.*, 1994; Cárdenas & Clements, 1993).

Essa estratégia de aumento de quantidade de epitopo expresso em fusão com uma proteína carregadora já foi empregada anteriormente (Khan *et al.*, 1994; Brey *et al.*, 1991; Broekhuijsen *et al.*, 1987), e um desses exemplos foi descrito com a própria flagelina. Um epitopo de rotavírus foi expresso em flagelina, com duas cópias em tandem, entretanto os anticorpos gerados em animais imunizados tanto por *Salmonella* atenuada expressando a proteína híbrida, como com a flagelina recombinante purificada, ambos com os dois epitopos, foi menor do que a resposta obtida com apenas uma cópia. Esse resultado parece refletir uma dependência conformacional desse epitopo, que não é eficientemente obtido na fusão flagelina-epitopo (Brey *et al.*, 1991). Em contraposição a esse resultado, Khan *et al.* (1994) obtiveram um dramático aumento na resposta de anticorpo a um epitopo da proteína P28 de *Schistosoma mansoni*, quando expresso em *Salmonella* atenuada, na forma de uma proteína de fusão, com um, dois, quatro e oito epitopos repetidos, associados com o fragmento C da toxina tetânica (porção não tóxica).

5.1- EFEITOS DAS INSERÇÕES NA FUNÇÃO FLAGELAR

Todos os plasmídios recombinantes, derivados dos vetores pLS408 e pLS503, foram introduzidos na linhagem de *Salmonella* Dublin SL5928. Essa linhagem foi utilizada na grande maioria dos trabalhos publicados na literatura, envolvendo o sistema flagelar de exposição de epitopos; a vantagem desse sorotipo de *Salmonella* é ser monofásico, apresentando apenas um gene cromossômico de flagelina. Assim sendo, para construção da linhagem parental, SL5928, uma única inserção de transposon no cromossomo, ligada ao gene *fliC(i)*, foi suficiente para torná-la aflagelada (Newton *et al.*, 1989). Além disso, *S. Dublin* promove o mesmo tipo de infecção em camundongos que *Salmonella* Typhimurium, favorecendo a extrapolação dos resultados obtidos em animais para seres humanos vacinados por *S. Typhi*.

As linhagens finais obtidas estão relacionadas na Tabela 1. A expressão das flagelinas híbridas foi demonstrada por “western-blot”, a partir de lisado total das células, empregando anticorpo anti-d e anti-M5. As proteínas híbridas produzidas pelas linhagens apresentaram tamanho maior que a da linhagem SL5930 (somente flagelina), e foram reconhecidas pelos dois anticorpos, indicando que a flagelina quimérica é expressa e contém o epítipo heterólogo (Figuras 15A e 15B).

O fato da flagelina, no sistema estudado, estar em um plasmídio derivado do pUC19, que é encontrado em múltiplas cópias dentro da célula (Flynn *et al.*, 1990; Verma *et al.*, 1995a) pode resultar em grande produção de proteína. O excesso, não utilizado na montagem do filamento, poderia ser degradado ou perdido para o meio de cultura, como indicam observações de “western-blot” a partir da proteína do sobrenadante de algumas linhagens, como a SL5930 (gene *fliC* no plasmídio), aparentemente em maior quantidade no sobrenadante que a flagelina da linhagem ICB5, que possui o gene *fliC* inserido no cromossomo (dados não apresentados).

A quantidade de flagelo exposta na superfície foi estimada a partir da detecção do filamento em imunoensaio, empregando anticorpo anti-d, contra as diferentes linhagens utilizadas como antígenos. A comparação da resposta obtida, para as linhagens usadas como controles e as construídas nesse trabalho, forneceu uma medida da quantidade relativa de flagelina, indicando quais linhagens teriam mais proteína exposta na superfície da célula. As primeiras observações realizadas com esse ensaio confirmaram os resultados de motilidade em semi-sólido e, também, foram condizentes com as observações obtidas através de microscopia eletrônica.

A linhagem ICB8, carregando o epitopo na região VI, que foi uma das inserções de escolha para exposição em um flagelo possivelmente funcional, apresenta motilidade em meio semi-sólido, embora em níveis reduzidos se comparada à linhagem parental, SL5930. Com isso, comprovamos que a segunda região de hipervariabilidade da flagelina realmente tolera modificações, no caso, a inserção de um epitopo de 16 aminoácidos. Essa inserção, ao contrário da realizada anteriormente nos trabalhos publicados com o vetor pLS408, foi feita sem qualquer deleção prévia do gene.

A linhagem ICB9, de acordo com a nossa previsão, deveria ser incapaz de exibir motilidade em meio semi-sólido, o que se confirmou por nossos resultados, compatíveis com observações anteriores de que modificações nessa região, mesmo que pequenas, são suficientes para abolir a motilidade (Homma *et al.*, 1987; Kuwajima *et al.*, 1989). A conservação absoluta, tanto em nível de proteína, quanto de DNA, das regiões terminais da flagelina, é um forte indício da ocorrência de interações fundamentais dessas regiões para o funcionamento flagelar. Para comprovar esse papel, construímos uma linhagem portadora de dois genes de flagelina, um deles funcional, integrado no cromossomo, e o segundo expresso no plasmídio (pRG8M). A linhagem contendo o gene “defectivo” em adição ao gene cromossomal tem motilidade reduzida, o que não se verifica se um gene totalmente funcional é adicionado (dados não apresentados). Esse dado comprova que a flagelina híbrida está interferindo com a função da molécula

selvagem, seja por competição com o sistema de exportação, reduzindo sua eficiência, seja por incorporação defeituosa ao filamento.

A linhagem ICB7, apresentando a inserção na região III, migra cerca de 1,5 cm no meio, ou seja, há motilidade, mas em nível consideravelmente reduzido. O nível de conservação dessa região do flagelo (77%) não permitia uma previsão segura da consequência de tal inserção, e o fato de termos obtido clones funcionais é um ponto vantajoso nesse sistema de expressão, uma vez que, provavelmente, o sistema apresenta uma plasticidade mais ampla do que a simples análise de homologia poderia sugerir.

A ocorrência de motilidade a partir de inserções em três diferentes regiões da molécula levou-nos a explorar a capacidade de incluir uma inserção dupla. Para tanto, construímos as linhagens ICB10 (regiões IV e VI) e ICB12 (regiões III e IV). Embora em ambos os casos tenha sido preservada a motilidade, essa foi seriamente reduzida. É possível que alterações em outras regiões dessas flagelinas híbridas possam restaurar a motilidade em níveis normais, no entanto nossos experimentos não exploram tal possibilidade.

As observações com microscopia eletrônica confirmaram os resultados de motilidade em meio semi-sólido. Aparentemente, os filamentos da ICB8 são semelhantes em forma e número aos dos controles. A região VI foi capaz de tolerar a inserção de mais de 96 pb e, ainda assim, conservou a motilidade, mas extremamente reduzida (dados não apresentados). A linhagem ICB7 apresentou um menor número de flagelos, quando comparada ao controle. Essas duas linhagens mostraram uma redução na motilidade.

A região VIII, como descrito anteriormente, é muito mais sensível a modificações, e nossos resultados confirmam esse fato. As primeiras observações realizadas com a linhagem ICB9, de ausência de motilidade e reação com anticorpo anti-d, em meio líquido, indicaram a falta do filamento na superfície da bactéria, fato que foi confirmado posteriormente, com microscopia eletrônica, como pode ser visto na Figura 19A. A flagelina híbrida detectada em “western-blot” a partir dessa linhagem, portanto, é intracelular, sendo que a determinação exata da sua localização não foi realizada. A

linhagem ICB11, portadora do mesmo plasmídio que a ICB9, mas possuindo uma cópia do gene *fliC*, integrado no cromossomo (linhagem derivada da ICB5), teve sua motilidade restaurada.

Verma *et al.* (1995a) relatam que obtiveram restauração parcial da motilidade, após a introdução de um plasmídio com o gene da flagelina íntegro, em uma linhagem de *Salmonella* portadora de um gene de flagelina híbrido no cromossomo que montava flagelo, mas não era móvel. Com microscopia eletrônica e anticorpo marcado com ouro coloidal, foi detectada a presença da flagelina híbrida no filamento flagelar. O mesmo foi obtido para algumas linhagens construídas por Acero-Reys (1994). No caso da inserção do epitopo na região VIII, a modificação leva à não formação de filamento, indicando que ela é mais crítica que as obtidas em trabalhos anteriores (Verma *et al.*, 1995a; Acero-Reyes, 1994). Além disso, essa região não deve estar exposta na superfície da filamento (Vonderviszt *et al.*, 1989; Newton *et al.*, 1989), mas sim envolvida na interação das outras subunidades no centro da estrutura, o que impossibilitaria o uso de anticorpo combinado com ouro coloidal, para tentar verificar se o filamento é constituído pelos dois tipos de flagelina. Uma análise preliminar por “western-blot” da flagelina da linhagem ICB11, obtida a partir do filamento purificado, empregando anticorpo anti-M e anti-d, indicou que o filamento é constituído somente por flagelina sem o epitopo (resultados não apresentados).

As duas linhagens com dois epitopos apresentaram motilidade positiva, mas reduzida em relação aos controles e às outras construções, como mencionado anteriormente. A linhagem ICB10 apresentou flagelos com estrutura aparentemente normal, mas em menor número (Figura 21A); já a linhagem ICB12 (Figura 21B) mostrou um padrão diferente do observado até o momento. A bactéria apresenta uma série de flagelos curtos que podem ser resultantes da modificação após a inserção, talvez atrapalhando a polimerização do filamento ou tornando-o mais susceptível à quebra durante a manipulação da linhagem para preparação das amostras observadas.

Até o momento, somente a região central havia sido empregada para inserção de epitopos. Em diversos trabalhos (Wu *et al.*, 1989; Newton *et al.*, 1989; Newton *et al.*, 1991, Verma *et al.*, 1995a e 1995b) tem sido relatada a presença de motilidade nas linhagens com flagelinas híbridas, algumas vezes, ocorrendo diminuição da mesma, quando comparada com linhagens selvagens. O motivo para a redução ou ausência de motilidade dos flagelos quiméricos não é conhecido, e nem a implicação desse fato na capacidade dessas linhagens estimularem uma resposta imune em indivíduos imunizados oralmente, onde a motilidade bacteriana poderia ser um importante determinante da colonização e infectividade intestinal (Verma *et al.*, 1995a).

5.2- IMUNOGENICIDADE DAS CONSTRUÇÕES

Ao contrário de imunizações com antígenos purificados, em que a quantidade do antígeno e o tipo de adjuvante são os parâmetros mais importantes na indução da resposta imune, a vacinação com linhagens vivas de bactérias envolve uma série ampla de fatores, muito dos quais são extremamente difíceis de se controlar experimentalmente. Como exposto na Introdução, a linhagem atenuada ideal é aquela que ainda mantém um certo nível de infectividade, induzindo uma resposta inflamatória quase subliminar, que não chega a provocar efeitos colaterais detectáveis. Quando se utiliza uma linhagem atenuada para expressão heteróloga, é fundamental que esse balanço entre infectividade e resposta inflamatória seja mantido. Nesse sentido, o uso de flagelos deve ser cuidadosamente avaliado em termos de efeito sobre a imunogenicidade das linhagens em questão.

Os resultados obtidos por Lockman & Curtiss (1990) a partir de linhagens com mutações, envolvendo somente genes controladores da biossíntese de flagelos ou motilidade, indicam que flagelo e motilidade possuem um papel na habilidade de

Salmonella Typhimurium infectar células em cultura de tecido, mas que os flagelos não são um fator de virulência na patogênese da doença desenvolvida por camundongos. Em sua tese de doutoramento, Acero-Reys (1994) observou que a motilidade não afeta nem a persistência de linhagens atenuadas, nem a imunogenicidade, como verificado a partir dos resultados da imunização intraperitoneal de camundongos BALB/c e C57/BL, com linhagens de *Salmonella* atenuadas, com e sem motilidade, carregando epitopos de toxina colérica no gene da flagelina.

O alto grau de virulência de *S. Typhimurium* para BALB/c, na ausência ou presença de flagelos ativos na sua superfície, sugere que a motilidade poderia ser irrelevante como fator de virulência para patógenos invasivos e intracelulares facultativos. Linhagens de *S. Typhimurium* móveis são imobilizadas pela viscosidade do muco que recobre o epitélio gastro-intestinal, e depois da invasão intracelular ter ocorrido, a infecção é disseminada através da migração de macrófagos infectados pelo hospedeiro (McCormick *et al.*, 1988).

A persistência, ou seja, o tempo de permanência das linhagens estudadas no fígado e baço de camundongos, foi outro parâmetro analisado para comparação das novas construções. Acero-Reys (1994) descreveu que linhagens sem motilidade persistem no baço e fígado por tempo semelhante às linhagens móveis, portanto optamos pela análise de duas novas linhagens para esse estudo, já que esses resultados indicam que não devem ser esperadas modificações na persistência por modificações na flagelina. Os resultados obtidos foram semelhantes para todas as linhagens, indicando que as inserções de epitopos heterólogos em outras regiões da flagelina não causam alteração na persistência das linhagens atenuadas. Diferenças na persistência de linhagens geralmente ocorrem quando comparadas linhagens com mecanismos de atenuação diferentes, como descrito no trabalho de O'Callaghan (1988), onde foi verificado que a persistência de linhagens com mutações *aroA/purA*, quando combinadas na mesma linhagem, apresenta resultados significativamente diferente de cepas carregando as mutações isoladamente.

A persistência no baço e fígado de camundongos BALB/c foi analisada para as linhagens ICB8 e ICB10, além dos controles SL5930 e SL7127. Os resultados obtidos são próximos aos descritos anteriormente por Acero-Reys (1994) e aos de Verma *et al.*, (1995a), Khan *et al.*, (1994), O'Callaghan *et al.*, (1988), onde o comportamento de linhagens *aroA* é similar.

A estabilidade dos plasmídios foi outro tema abordado no trabalho de Acero-Reys (1994). Através da análise do nível de anticorpos contra flagelina, gerado em camundongos imunizados via intraperitoneal, com linhagens portadoras de genes de flagelina híbrido no cromossomo e em plasmídios, foi verificado que a antigenicidade independe da estabilização da informação clonada. Cárdenas & Clements (1993) também observaram fato semelhante, utilizando imunização via oral. Níveis de anticorpos humorais e de mucosa foram maiores quando um antígeno carregado por *Salmonella* atenuada foi expresso a partir de um plasmídio estabilizado pela presença de antibiótico, durante o crescimento da linhagem utilizada na imunização, do que expresso de forma estável no cromossomo. Os níveis de anticorpos específicos ao antígeno foram correlacionados com a quantidade de antígeno apresentado ao GALT. Estas observações são importantes, e sugerem que um evento crítico para o desenvolvimento de uma resposta contra um antígeno heterólogo carregado por uma linhagem atenuada é a quantidade inicial de antígeno que estimula o GALT e não a persistência das linhagens nos tecidos, que seria considerado um fator secundário.

A comparação da resposta imune de camundongos inoculados com as diferentes linhagens foi feita com base nos resultados obtidos, empregando imunoensaio, e analisando a resposta humoral contra flagelina e peptídeo SM5(1-15). O fato da resposta apresentada contra a flagelina ser mais elevada que a resposta para o peptídeo, provavelmente é o reflexo da maior quantidade de epitopos de célula B para o primeiro antígeno mencionado, além da presença de epitopos de célula T-helper também expostos na flagelina, se comparados somente com um epitopo ou com poucas cópias do epitopo heterólogo inserido. Esse resultado é semelhante ao obtido em outros trabalhos utilizando

o sistema flagelina como carregador (Newton *et al.*, 1989 e 1991; Brey *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1989).

As bactérias empregadas no trabalho induziram excelente resposta contra flagelina. Em outros sistemas de exposição, o mesmo não se verifica. Por exemplo, a proteína periplasmática MalE, que pode ser super-expressa sem qualquer efeito deletério no crescimento de *E. coli* ou de *Salmonella* sp, apresenta um sítio permissivo (após aminoácido 133) para inserção de epitopos, o qual foi extensivamente utilizado para construção de híbridos (para revisão ver Leclerc *et al.*, 1994). Embora a imunização com proteína purificada resulte em altos níveis de anticorpos anti-MalE e, na maioria absoluta dos casos, contra o peptídeo heterólogo inserido, a expressão em linhagem atenuada de *Salmonella* tem um comportamento diverso: linhagens expressando MalE selvagem geram altos níveis de anticorpos, tanto em imunização intraperitoneal, quanto oral, mas a inserção de um epítipo reduz drasticamente, ou mesmo, destrói por completo a imunogenicidade da proteína carregadora; não se verifica qualquer resposta contra o peptídeo inserido (Newton *et al.*, 1995b; Newton *et al.*, 1995c, resultados não publicados).

O primeiro experimento para verificação da resposta imune foi semelhante ao realizado por Newton e colaboradores (1991), quando foi descrita a obtenção da linhagem SL7127. Grupos de animais foram inoculados com as linhagens ICB7, ICB8, ICB9, ICB10 e ICB11, e os controles ICB5, SL5930 e SL7127, conforme descrito em resultados (4.3.2.1).

Como pode ser visto na Tabela 3, uma forte resposta contra flagelina foi obtida em todos os grupos, demonstrando que, ao contrário do que ocorre no sistema MalE, mesmo após a inserção de dois epitopos (linhagem ICB10), a resposta imune dirigida contra a proteína carregadora é pouco alterada. A ocorrência de diferenças individuais é um fato observado com frequência, mesmo utilizando-se camundongos isogênicos.

Quanto à resposta contra o peptídeo, a imunização com bactérias vivas pela via intraperitoneal sugere que duas cópias do epitopo são superiores a uma cópia única, uma vez que, no grupo imunizado com a linhagem ICB10, houve melhor resposta. No entanto, o número limitado de animais não permite uma afirmativa segura a esse respeito. A maior dificuldade em se comparar linhagens com imunogenicidade semelhante é a ocorrência de diferenças individuais entre os camundongos, incluindo-se animais que, tendo recebido exatamente a mesma inoculação, não respondem ao antígeno em questão. Esse tipo de comportamento não é inusitado: experimentos realizados com diferentes híbridos LamB/HIV expressos em *Salmonella* Typhimurium (SL3261) mostraram variações individuais que não puderam ser contornadas, mesmo utilizando 16 animais por grupo (Newton, *et al.*, 1995b).

Duas outras linhagens originaram níveis detectáveis de anticorpos contra o peptídeo inserido: ICB7 e ICB11. Não se verificou anticorpos em animais imunizados com a linhagem ICB8, portadora do inserto na região hipervariável VI, todavia, após imunização com a mesma linhagem inativada, anticorpos contra o peptídeo foram detectados. A imunização com linhagens inativadas foi empregada por permitir um aumento no número de bactérias administradas aos animais, portanto, elevando a quantidade de antígeno. Os camundongos imunizados com as linhagens ICB7 e ICB11 inativadas não apresentaram resposta. Diversos fatores podem explicar a ausência de resposta. Embora não haja evidência experimental nesse sentido, é possível que existam diferenças no processamento da flagelina a partir de linhagens inativadas ou vivas, o que pode influenciar a eficiência de exposição do epitopo heterólogo.

Devemos salientar igualmente que os experimentos de imunização foram realizados em épocas diferentes: o elevado número de animais utilizados em cada um deles torna impraticável a análise simultânea de todas as linhagens.

Apesar dos títulos de anticorpos para o peptídeo terem sido baixos, em nosso experimento de proteção, através de desafio com a linhagem de *Streptococcus pyogenes* tipo 5, verificamos que os animais imunizados com as linhagens portadoras do

epitopo na flagelina, se recuperaram mais rapidamente. Os animais imunizados com as linhagens sem epitopos permaneceram doentes por um tempo maior, cerca de oito dias, enquanto que os camundongos imunizados com as linhagens que possuíam o epitopo se recuperavam em cerca de três dias. A linhagem de *S. pyogenes* disponível para os experimentos de desafio não foi capaz de matar os animais não vacinados, o que impediu uma quantificação mais precisa do potencial vacinal de nossas construções (resultados não apresentados).

A utilização de linhagens inativadas de *Salmonella* vem sendo empregada por muito tempo como vacina e, apesar de ocorrerem reações adversas severas, há a formação de altos títulos de anticorpos. Cárdenas e colaboradores (1994) verificaram o efeito, na resposta humoral, da viabilidade de linhagens carregando um antígeno heterólogo intracelularmente, obtendo praticamente o mesmo resultado com linhagens inativadas e vivas. Linhagens de *Salmonella* viáveis, que persistem dentro do macrófago, não contribuem efetivamente na resposta humoral do hospedeiro, especialmente no GALT. Dentro desse contexto, a *Salmonella* deve primeiro entrar em uma célula APC para processamento e apresentação de antígeno em combinação com o complexo de histocompatibilidade. Fayolle e colaboradores (1994) obtiveram resposta humoral similar contra o antígeno heterólogo, testando três doses de bactéria inativada (5×10^7 , 5×10^8 e 10^8 bactérias) e bactéria viva (5×10^6).

Wick e colaboradores (1994), estudando *in vitro* os parâmetros que influenciam o processamento de epitopos, observaram que uma linhagem inativada de *S. Typhimurium*, expressando o epitopo heterólogo, sofreu um processamento mais eficiente, resultando na liberação dos epitopos da bactéria morta mais rapidamente do que quando se utiliza bactérias vivas. Esse resultado pode ser explicado por um processo mais eficiente de tamponamento do pH do fagolisossomo, realizado pelas bactérias vivas, que retardaria a lise das mesmas. Alternativamente, este resultado poderia ser devido ao aumento da habilidade de macrófagos degradarem a bactéria morta mais rapidamente, independente de qualquer efeito que a bactéria pudesse ter sobre o pH do fagolisossomo.

A localização de antígenos na bactéria carregadora parece influenciar menos no processamento dos epitopos. Wick, no mesmo trabalho citado anteriormente, mostrou que o epitopo HEL(52-61) expresso como proteína de fusão solúvel, em qualquer compartimento, foi processado em poucas horas, para apresentação via MHC II, por um mecanismo que requer fagocitose e passagem através de um compartimento ácido. Esse resultado fornece uma explicação para as observações prévias de altos títulos de anticorpos, após imunização de camundongos com linhagens de *Salmonella* atenuadas, expressando epitopos antigênicos heterólogos no citoplasma, como foi observado para a linhagem ICB9.

Por outro lado, a quantidade de antígeno apresentada ao sistema imune vem sendo colocada como um dos fatores principais para obtenção de uma boa resposta (Newton *et al.*, 1995b; Wick *et al.*, 1994; Fayolle *et al.*, 1994; Cárdenas *et al.*, 1994 e Cárdenas & Clements, 1993). Empregando a bactéria inteira como inóculo, a quantidade de antígeno heterólogo fica difícil de ser controlada, por diferenças no acúmulo de flagelina apresentada pelas linhagens, como pode ser visto no “western-blot”. Esse fato levou-nos a utilizar flagelina purificada, basicamente das linhagens com inserção nas regiões IV (controle) VI e III, e dupla inserção (VI e IV). Não empregamos a linhagem com inserto na região VIII por essa não apresentar filamentos montados, dificultando a purificação da flagelina.

Foram empregadas cerca de 10 µg de flagelina purificada por animal, em três doses (0, 21 e 35 dias). Os resultados obtidos contra flagelina foram extremamente elevados para todas as linhagens, havendo somente uma certa variação com o soro dos animais imunizados com a flagelina híbrida das linhagens ICB8 e ICB10. Esse fato pode ter ocorrido por existirem variações na quantidade de proteína usada no inóculo, devido a contaminação com outras proteínas durante o processo de purificação da flagelina. De qualquer forma, a resposta imune não deve ter sido prejudicada de maneira acentuada. Fayolle *et al.* (1994), testando diferentes quantidades de proteína MalE como antígeno, via intraperitoneal, verificou que houve uma grande diminuição na resposta imune quando

utilizou doses menores que 0,1 µg de proteína, sendo que entre 1 µg e 10 µg a diferença foi muito pequena.

Foram perdidos alguns animais do grupo controle SL7127, após a segunda dose da imunização e, portanto, o título apresentado nesse grupo é referente aos resultados com soro coletado oito dias após a segunda dose. A resposta imune obtida com o soro da terceira dose deve ser um pouco mais alta, como observado também no trabalho já citado anteriormente (Newton *et al.*, 1991), e que descreve uma elevação no título de anticorpos com o aumento no número de doses empregadas. Novamente, contra a flagelina foram obtidos títulos bastante elevados para todas as linhagens (Tabela 4). Todos os animais imunizados com a linhagem ICB8 responderam ao peptídeo em contraposição a apenas um do grupo imunizado com a ICB7. Os animais imunizados com a linhagem ICB10 apresentaram uma resposta em níveis próximos aos do controle SL7127.

Numa tentativa de verificar o efeito da presença dos dois epitopos heterólogos na flagelina, foi feita uma construção com a inserção de um segundo epitopo na região III, além da colocada na região IV. A imunização realizada foi intraperitoneal, com bactéria viva, que havia produzido anteriormente bons títulos de anticorpos contra o peptídeo. Os títulos de anticorpos obtidos nesse experimento (Tabela 5), imunizando animais com SL7127 e as duas linhagens com as duplas inserções, foram mais baixos do que aqueles obtidos no primeiro experimento citado, empregando bactérias vivas (Tabela 3). Esse experimento foi repetido e resultados semelhantes aos anteriores foram obtidos. Uma das explicações possíveis para tal diferença é a estabilidade dos plasmídios em ambos os experimentos. De fato, resultados preliminares obtidos por E. Sbrogio (comunicação pessoal), indicam que linhagens recém transformadas apresentam maior estabilidade em animais inoculados, do que linhagens estocadas por períodos maiores de tempo. Essa estabilidade diminui sensivelmente após períodos de estocagem, mesmo em freezer -70°C.

Brey e colaboradores (1991) utilizaram a flagelina como carregadora de epitopos heterólogos e, como citado anteriormente, quando empregaram o sistema com

dois epitopos de rotavírus inseridos em tandem, obtiveram uma resposta baixa contra eles, provavelmente devido a problemas conformacionais do epitopo na flagelina. Foram testados, também na região hipervariável da flagelina, outros dois epitopos (VR1 e VR2) de *N. meningitidis*, da proteína de membrana externa de classe I (OMP), que são implicados como antígenos protetores. Foram feitas três construções: uma com quatro seqüências do inserto VR1, outra com três cópias de VR2 e a terceira composta por quatro insertos de VR1 seguidos por três de VR2. Cada uma das linhagens híbridas VR1 e VR2 produziu uma flagelina que conferiu motilidade à bactéria, e foi detectada em “western-blot”. A imunização de camundongos com a flagelina híbrida purificada dessas três construções foi capaz de induzir potente resposta contra a flagelina, assim como altos títulos contra o peptídeo.

Existem vários outros exemplos da utilização de múltiplas cópias de epitopos, mas sempre colocadas em tandem. No sistema que foi apresentado neste trabalho, as inserções são separadas por dezenas de aminoácidos; além disso, não foi testado se a utilização de cópias do epitopo de forma seguida, nas novas regiões testadas para inserção de epitopos, seria mais imunogênica. Sabemos que a região VI aceitou inserções, sem deleções prévias nessa região, de mais de 96 pb (resultados não apresentados) e, ainda, foi capaz de montar o filamento flagelar.

Em resumo, demonstramos nesse trabalho que:

- 1- inserções (sem deleções prévias) nas regiões III e VI de flagelina são toleradas sem perda da função flagelar;
- 2- o sítio de inserção escolhido na região VI tolera a adição de 96 pb, sendo mantida a motilidade;
- 3- no mínimo duas outras regiões de flagelina podem ser utilizadas para inserção de epitopos heterólogos, mantendo-se a capacidade de formação de filamentos flagelares que retêm elevada imunogenicidade, tanto apresentados na superfície de bactérias vivas como inativadas.

4- inserções na região VIII (C-terminal) da flagelina não impedem a síntese da proteína, mas bloqueiam a motilidade: não há formação de filamentos externos;

5- resposta humoral contra o peptídeo inserido foi verificada em animais imunizados com construções nas regiões III, IV, VI e VIII, além da dupla inserção (IV e VI).

5.3- PERSPECTIVAS FUTURAS COM O SISTEMA FLAGELAR

Nossos resultados abrem algumas possibilidades imediatas de investigação. A observação de que inserções tanto na região III quanto nas regiões IV e VI são toleradas, sugere que pode ser viável a substituição de toda a região compreendida entre tais sítios por aminoácidos heterólogos, o que, sem dúvida, deve aumentar sensivelmente os níveis de anticorpos produzidos contra o antígeno de interesse. Além disso, o fato da inserção na região VIII ter produzido flagelinas intracelulares, mas imunogênicas, pode ser aproveitado para explorar a indução de respostas contra epitopos T, os quais, na molécula nativa, localizam-se exatamente nas regiões conservadas terminais.

Analisando-se os resultados publicados na literatura, bem como os resultados obtidos nesse trabalho, torna-se evidente que não existe uma solução única, um vetor universal que permitirá a obtenção de altos níveis de anticorpos contra qualquer sequência heteróloga escolhida. Essa afirmação é válida não só para o sistema flagelar de exposição de epitopos, mas para todas as formas de expressão envolvendo linhagens atenuadas. As leis que governam o processamento de antígenos complexos ainda são um mistério e muitos dos dados disponíveis na literatura soam conflitantes. No entanto, muitos grupos continuam investindo esforços na construção de vetores de exposição que levem em conta os parâmetros considerados importantes para imunogenicidade: vetores estáveis, fortemente induzíveis *in vivo*, capazes de aceitar inserções de vários epitopos e,

possivelmente, incorporando fatores adjuvantes como a interleucina-1 (Beckers *et al.*, 1993), ou sítios de clivagem para proteínas presentes em células processadoras de antígenos, como por exemplo a catepsina (Verma *et al.*, 1995a e 1995b).

Embora no momento seja difícil avaliar as possibilidades de tais sistemas serem realmente aproveitados em vacinas, tais estratégias são fundamentais para que se aumente o conhecimento sobre a resposta imune gerada a partir de uma fascinante mistura de antígenos: a bactéria viva.

6- BIBLIOGRAFIA

- ACERO-REYES, J. R.- Inserção de epitopos da toxina colérica em flagelina de Salmonella: imunogenicidade e efeitos sobre a motilidade e estabilidade das linhagens in vivo. São Paulo, 95p (Tese-doutorado)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1994.
- AGTERBERG, M.; ADRIAANSE, H. & TOMASSEN, J.- Use of outer membrane protein PhoE as a carrier for the transport of a foreign antigenic determinant to the cell surface of *Escherichia coli* K12. Gene **59**: 145-150, 1987.
- AIZAWA, S.-I.- Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. Molec. Microbiol., **19**:1-6, 1996.
- BEACHEY, E. H.; SEYER, J. M.; DALE, J. B.; SIMPSON, W. A. & KANG, A. H.- Type-specific immunity evoked by synthetic peptide of *Streptococcus pyogenes* M protein. Nature. **292**: 457-459, 1981.
- BEACHEY, E. H.; TARTAR, A.; SEYER, J. M. & CHEDID, L.- Epitope-specific protective immunogenicity of chemically synthetisized 13-, 18- and 23-residue fragments of streptococcal M protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **81**: 2203-2207, 1984.
- BECKERS, W.; VILLA, L.; GONFLONI, S.; CASTAGNOLI, L.; NEWTON, S. M. C.; CESARINI, G. & GHIARA, P.- Increasing the immunogenicity of protein antigens through the genetic insertion of VQGEESNDK sequence of human IL-1 β into their sequence. J. Immunol. **151**: 1757-1764, 1993.

- BENJAMIN, W. H.; HALL, P. & BRILES, D. E.- A *hemA* mutation renders *Salmonella typhimurium* avirulent in mice, yet capable of eliciting protection against intravenous infection with *S. typhimurium*. Microb. Pathog., **11**: 289-296, 1991.
- BOWE, F.; O'GOARA, P.; MASKELL, D.; CAFFERKEY, M. & DOUGAN, G- *In vivo* properties of *Yersinia enterocolitica aroA* mutants. Infect. Immun., **57**: 3234-3236, 1989.
- BREY, R. N.; BIXLER, G. S.; FULGINITI, J. P.; DILTS, D. A. & SABARA, M. I- Oral delivery of antigens in the live bacterial vectors. Adv. Exp. Med. Biol., **303**: 169-185, 1991.
- BROEKHUIJSEN, M. P.; VAN RIJN, J. M. M.; BLON, A. J. M.; POUWELS, P. H.; ENGER-VALK, B. E.; BROWN, F. & FRANCIS, M. J.- Fusion proteins with multiple copies of the major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus protect both the natural host and laboratory animals. J. Gen. Virol., **68**: 3137-3143, 1987.
- BROWN, A.; HORMAECHE, C. E.; DEMARCO DE HORMAECHE, R.; WINTHER, W.; DOUGAN, G.; MASKELL, D. & STOCKER, B. A. D.- Attenuated *aroA S. typhimurium* vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned beta-galactosidase in mice. J. Infect. Dis., **155**: 86-92, 1986.
- CÁRDENAS, L. & CLEMENTS, D. J.- Stability, immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors. Vaccine, **11**: 126-135, 1993.
- CÁRDENAS, L.; DASGUPTA, U. & CLEMENTS, J. D.- Influence of strain viability and antigen dose on the use of attenuated mutants of *Salmonella* as vaccine carriers. Vaccine, **12**: 833-840, 1994.
- CHAMBERLAIN, L.; STRUGNELL, R.; DOUGAN, G.; HORMAECHE, C. E. & DEMARCO DE HORMAECHE, R.- *Neisseria gonorrhoeae* strain MS11 harbouring a

- mutation in gene *aroA* is attenuated and immunogenic. Microb. Pathog., **15**: 51-63, 1993.
- CHATFIELD, S. N.; STRUGNELL, R. A. & DOUGAN, G.- Live *Salmonella* as vaccines and carriers of foreign antigenic determinants. Vaccine, **7**: 495-498, 1989.
- CHATFIELD, S. N.; DORMAN, C. J.; HAYWARD, C. & DOUGAN, G.- Role of *ompR*-dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: mutants deficient in both *OmpC* and *OmpF* are attenuated *in vivo*. Infect. Immun., **59**: 449-452, 1991.
- CHATFIELD, S. N.; FAIRWEATHER, N., CHARLES, I.; PICKARD, D., LEVINE, M.; HONE, D., POSADA, M., STRUGNELL, R. A & DOUGAN, G.- Construction of a genetically defined *Salmonella typhi* Ty2 *aroA*, *aroC* mutant for the engineering of a candidate oral typhoid-tetanus vaccine. Vaccine, **10**: 53-60, 1992a.
- CHATFIELD, S. N.; STRAHAN, K.; PICKARD, D.; CHARLES, I. G.; HORMAECHE, C. E. & DOUGAN, G.- Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htrA* and *aroA* in the murine salmonellosis model. Microb Pathog., **12**: 145-151, 1992b.
- CHATFIELD, S. N.; CHARLES, I. G.; MAKOFF, A. J.; OXER, M. D.; DOUGAN, G.; PICKARD, D.; SLATER, D. & FAIRWEATHER, N. F.- Use of the *nirB* promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. Bio/Technology. **10**: 888-892, 1992c.
- CHARBIT, A.; MOLLA, A.; SAURIN, W. & HOFNUNG, M.- Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of gram-negative bacteria. Gene, **70**: 181-189, 1988.

- CLEMENTS, J.; LYON, F. L.; LOWE, K. L.; FARRAND, A. F. & MORSHIDY, S. E.- Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella enteritidis* containing a recombinant plasmid which codes for production of the B subunit of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin. Infect. Immun., **53**: 685-692, 1986.
- CLEMENTS, J. D.- Use of attenuated mutants of *Salmonella* as carriers for delivery of heterologous antigens to the secretory immune system. Pathol. Immunopathol. Res. **6**: 137-146, 1987.
- CURTISS, R. III. & KELLY, S. M.- *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. Infect. Immun., **55**: 3035-3043, 1987.
- CURTISS, R. III.; GALÁN, J. E.; NAKAYAMA, K. & KELLY, S.- Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains *in vivo*. Res. Microbiol., **141**: 797-805, 1990.
- DALE, J. B.; SIMMONS, M.; CHIANG, E. C. & CHIANG, E. Y.- Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine. Vaccine, **14**: 944-948, 1996.
- DORMAN, C. J.; CHATFIELD, S. N.; HIGGINS, C. H.; HAYWARD, C. & DOUGAN, G.- Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated *in vivo*. Infect. Immun., **57**: 2136-2140, 1989.
- DOUGAN, G.; CHATFIELD, S. N.; PICKARD, D.; BESTER, J.; O'CALLAGHAN, D. & MASKELL, D.- Construction and characterization of vaccine strains of *Salmonella* harboring mutations in two different *aro* genes. J. Infect. Dis., **158**: 1329-1335, 1988.
- DOUGAN, G.- The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens: implications for oral vaccine development. Microbiology, **140**: 215-224, 1994.

- DOWER, W. J., MILLER, J. F. & RAGSDALE, C. W.- High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res., **16**: 6127-6145, 1988.
- EDWARDS, M. F. & STOCKER, B. A. D.- Construction of Δ aroA his Δ pur strains of *Salmonella typhi*. J. Bacteriol., **170**: 3991-3995, 1988.
- European Commission COST/STD- Initiative on European Vaccine, Research, Bergen, 1994. Vaccine delivery systems report of the expert panel VII. Vaccine, **14**: 665-90, 1996.
- EVEREST, P.; FRANKEL, G.; LI, J.; LUND, P.; CHATFIELD, S. & DOUGAN, G.- Expression of LacZ from *htrA*, *nirB* and *groE* promoters in *Salmonella* vaccine strain: influence of growth in mammalian cells. FEMS Microbiol. Lett., **126**: 97-102, 1995.
- FAYOLLE, C.; O'CALLAGHAN, D.; MARTINEAU, P.; CHARBIT, A.; CLEMENT, J. M.; HOFNUNG, M. & LECLERC, C.- Genetic control of antibody responses induced against an antigen delivered by recombinant attenuated *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun., **62**: 4310-4319, 1994.
- FLYNN, J. L.; WEISS, W. R.; NORRIS, K. A.; SEIFERT, H. S.; KUMAR, S. & SO, M.- Generation of a cytotoxic T-lymphocyte response using a *Salmonella* antigen-delivery system. Molec. Microbiol., **4**: 2111- 2118, 1990.
- GERMANIER, R. & FÜRER, E.- Immunity in experimental salmonellosis. II. Basis for the avirulence and protective capacity of *galE* mutants of *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun., **4**: 663-672, 1971.
- GERMANIER, R. & FÜRER, E.- Isolation and characterization of *GalE* mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral, typhoid vaccine. J. Infect. Dis., **131**:553-558, 1975.

- GONZALEZ, C.; HONE, D.H.; NORIEGA, F. R.; TACKET, C. O; DAVIS, R. J.; LOSONSKY, G. A; NATARO, J. P.; HOFFMAN, D. G.; MALIK, A.; NARDIN, E.; SZTEIN, M. B.; HEPPNER, D. G.; FOUTS, T. R.; ISIBASI, A. & LEVINE, M. M.- *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: strain construction and safety and immunogenicity in humans. J. Infect. Dis., **169**: 927-931, 1994.
- HARLOW, E.; LANE, D.- Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- HARSHEY, R. M. & TOGUCHI, A.- Spinning tails: homologies among bacterial flagellar systems. Trends Microbiol., **4**: 226-231, 1996.
- HASSETT, D. E. & WHITTON, L.- DNA immunization. Trends Microbiol., **4**: 307-312, 1996.
- HE, X. S.; RIVKINA, M.; HOVI, M.; STOCKER, B. A. D. & ROBINSON, W. S.- A novel *Salmonella* flagellin system for heterologous epitopes. In: Vaccines 93: Molecular approaches to the control of infectious diseases, Cold Spring Harbor Laboratory, 1993. pp 427-431.
- HESS, J.; GENTSCHEV, I.; MIKO, D.; WELZEL, M.; LADEL, C.; GOEBEL, W & KAUFMANN, S. H. E. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **93**: 1458-1463, 1996.
- HOHMANN, E. L.; OLETTA, C. A.; MILLER, S. I.- Evaluation of *phoP/phoQ*-deleted, *aroA*-deleted live oral *Salmonella typhi* vaccine strain in human volunteers. Vaccine, **14**: 19-24, 1996.

- HOISETH, S. K. & STOCKER, B. A. D.- Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. Nature, **291**: 238-239, 1981.
- HOMMA, M.; FUJITA, H.; YAMAGUCHI, S. & IINO, T.- Regions of *Salmonella typhimurium* flagellin essential for its polymerization and excretion. J. Bacteriol., **369**: 291-296, 1987.
- HONE, D.; MORONA, R.; ATTRIDGE, S. R.; HACKETT, J.- Construction of defined *galE* mutants of *Salmonella* for use as vaccines. J. Infect. Dis. **156**: 167-174, 1987.
- HONE, D. M.; ATTRIDGE, S. R.; FORREST, B.; MORONA, R.; DANIELS, D.; LABROOY, J. T.; BARTHOLOMEUSZ, R. C. A.; SHEARMAN, D. J. C. & HACKETT, J.- A *galE* *via* (Vi antigen-negative) mutant of *Salmonella typhi* Ty2 retains virulence in humans. Infect. Immun., **56**: 1326-1333, 1988.
- HOPKINS, S.; KRAEHNBUHL, J. P.; SCHÖDEL, F.; POTTS, A.; PETERSON, D.; GRANDI, P. & NARDELLI-HAEFLIGER, D.- A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization Infect. Immun., **63**: 3279-3286, 1995.
- IBRAHIM, G. F.; FLEET, G. H.; LYONS, M. J. & WALKER, R. A.- Method for the isolation of highly purified *Salmonella* flagellins. J. Clin. Microbiol., **22**: 1040-1044, 1985.
- JACOB, C. O.; SELA, M. & ARNON, R.- Antibodies against synthetic peptides of the B subunit of cholera toxin: crossreaction and neutralization of the toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**: 7611-7615, 1983.
- JOHNSON, K. J.; CHARLES, I. G.; MILLER, I. A.; PICKARD, D.; O'GOARA, P.; COSTA, G.; ALI, T. & HORMAECHE, C. E.- The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. Mol. Microbiol., **5**: 401-407, 1991.

- JOYS, T. M.- The covalent structure of the phase-1 flagellar filament protein of *Salmonella typhimurium* and its comparison with other flagellins. J. Biol. Chem., **260**: 15758-15761, 1985.
- JOYS, T. M. & SCHÖEDEL, F.- Epitope mapping of the *d* flagellar antigen of *Salmonella muenchen*. Infect. Immun., **59**: 3330-3332, 1991.
- JOYS, T. M. & STREET, N. E.- Mapping of T-cell epitopes of flagellar antigen *d* of *Salmonella muenchen*. Infect. Immun., **61**: 1146-1148, 1993.
- KHAN, C. M. A.; VILLARREAL-RAMOS, B.; PIERCE, R. J.; DEMARCO DE HORMAECHE, R.; MCNEILL, H.; ALI, T.; CHATFIELD, S.; CAPRON, A.; DOUGAN, G. & HORMAECHE, C. E.- Construction, expression, and immunogenicity of multiple tandem copies of the *Schistosoma mansoni* peptide 115-131 of the P28 glutathione S-transferase expressed as C-terminal fusions to tetanus toxin fragment C in a live Aro- attenuated vaccine strain of *Salmonella*. J. Immunol., **153**: 5634-5642, 1994.
- KAREN, K. L.; CHATFIELD, S.; KUKLIN, N. & ROUSE, B. T.- Differential induction of carrier antigen-specific immunity by *Salmonella typhimurium* live-vaccine strains after single mucosal or intravenous immunization of BalB/c mice. Infect. Immun., **63**: 4557-4563, 1995.
- KARNELL, A.; CAM, P. D.; VERMA, N. K. & LINDBERG, A. A.- *aroD* deletion attenuates *Shigella flexneri* strain 2457T and makes it a safe and efficacious oral vaccine in monkeys. Vaccine, **11**: 830-836, 1993.
- KAUFFMANN, F. THE KAUFFMANN- White schema. In: Classification of Bacteria. Scandinavian University Books, Copenhagen, Munksgaard. pp.61-63, 1975.

- KUWAJIMA, G.- Construction of a minimum-size functional flagellin of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **170**: 3305-3309, 1988.
- KUWAJIMA, G.; KAWAGISHI, I.; HOMMA, M.; ASAKA, J.-I.; KONDO, E. & MACNAB, R. M.- Export of an N-terminal fragment of *Escherichia coli* flagellin by a flagellum-specific pathway. Proc. Natl. Acad. Sci USA, **86**: 4953-4957, 1989.
- LAEMMLI, U. K.- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**: 680-695, 1970.
- LECLERC, C.; LO-MAN, R.; CHARBIT, A.; MARTINEAU, P.; CLÉMENT, J. M. & HOFNUNG, M. Immunogenicity of viral B- and T- cell epitopes expressed in recombinant bacterial proteins. Intern. Rev. Immunol., **11**:123-132, 1994.
- LEVI, R. & ARNON, R.- Effective protection of mice from viral challenge by an influenza synthetic recombinant vaccine with cross-strain specificity. In: Vaccines 95: Molecular approaches to the control of infectious diseases, Cold Spring Harbor Laboratory, 1995. pp. 69-75.
- LEVI, R. & ARNON, R.- Synthetic recombinant influenza vaccine induces efficient long-term immunity and cross-strain protection. Vaccine, **14**: 85-92, 1996.
- LEVINE, M. M.; HERRINGTON, D.; MURPHY, J. R.; MORRIS, J.G.; LOSONSKY, G.; TALL, B.; LINDBERG, A. A.; SVENSON, S.; BAQAR, S.; EDWARDS, M. F. & STOCKER, B. A. D.- Safety, infectivity, immunogenicity and *in vivo* stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 541Ty and 543Ty, as live oral vaccines in humans. J. Clin. Invest., **79**: 888-902, 1987.
- LEVINE, M. M.; FERRECCIO, C.; BLACK R. E.; TACKET C. O.; GERMANIER, R. & CHILEAN TYPHOID COMMITTEE- Progress in vaccines against typhoid fever Rev. Infect. Dis., Vol.II- Supplement 3 pp. S552-S566, 1989.

- LOCKMAN, H. A. & CURTISS, R. III.- *Salmonella typhimurium* mutants lacking flagella or motility remain virulent in BalB/c mice. Infect. Immun., **58**: 137-143, 1990.
- LONDOÑO, L. P.; CHATFIELD, S.; TINDLE, R. W.; HERD, K.; GAO, X. M.; FRAZER, I. & DOUGAN, G.- Immunization of mice using *Salmonella typhimurium* expressing human papillomavirus type16E7 epitopes inserted into hepatitis B virus core antigen. Vaccine, **14**: 545-552, 1996.
- MASKELL, D. J.; SWEENEY, K. J.; O'CALLAGHAN, D.; HORMAECHE, C. E.; LIEW, F. Y. & DOUGAN, G.- *Salmonella typhimurium aroA* mutants as carriers of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit to the murine secretory and systemic immune systems. Microb Pathog, **2**: 211-221, 1987.
- MCCORMICK, B. A.; STOCKER, B. A. D.; LAUX, D. C.; COHEN, P.S.- Roles of motility, chemotaxis, and penetration through and growth in intestinal mucus in the ability of an avirulent strain of *Salmonella typhimurium* to colonize the large intestine of streptomycin-treated mice. Infect. Immun., **56**: 2209-2217, 1988.
- MCEWEN, J.; LEVI, R.; HORWITZ, R. J. & ARNON, R.- Synthetic recombinant vaccine expressing influenza haemagglutinin epitope in *Salmonella* flagellin leads to partial protection in mice. Vaccine, **10**: 405-411, 1992.
- MILLER, S. I.; KUKRAL, A. M. & MEKALANOS, J. J.- A two component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence in mice. Proc. Natl. Acad. Sci.USA, **86**: 5054-5058, 1989.
- MIMS, C. A.; PLAYFAIR, J. H. L.; ROITT, I. M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R.- Medical microbiology. London, Mosby- Year Book Europe, 1993. pp 36.1-36-20)

- MOLINA, N. C. & PARKER, C. D.- Murine antibody response to oral infection with live *aroA* recombinant *Salmonella dublin* vaccine strains expressing filamentous hemagglutinin antigen from *Bordetella pertussis*. Infect. Immun., **58**: 2523-2528, 1990.
- MUUKUR, T. K. S.; MCDOWELL, G. H.; STOCKER, B. A. D. & LASCELLES, A. K. J.- Protection against experimental salmonellosis in mice and sheep by immunisation with aromatic-dependent *Salmonella typhimurium*. J. Med. Microbiol., **24**: 11-19, 1987.
- NEWTON, S. M. C.; JACOB, C. O. & STOCKER, B. A. D.- Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin. Science, **244**: 70-73, 1989.
- NEWTON, S. M. C.; KOTB, M.; POIRIER, T. P.; STOCKER, B. A. D. & BEACHEY, E. H.- Expression and immunogenicity of a streptococcal M protein epitope inserted in *Salmonella* flagellin. Infect. Immun., **59**: 2158-2165, 1991.
- NEWTON, S. M. C.; JOYS, T. M.; ANDERSON, S. A.; KENNEDY, R. C.; HOVI, M. E. & STOCKER, B. A. D.- Expression and immunogenicity of an 18-residue epitope of HIV gp41 inserted in the flagellar protein of a *Salmonella* live vaccine. Res. Microbiol., **146**: 203-216, 1995a.
- NEWTON, S. M. C.; KLEBBA, P. E. K.; HOFNUNG, M. & CHARBIT, A.- Studies of the anaerobically induced promoter *pnirB* and the improved expression of bacterial antigens. Res. Microbiol., **146**:193-202, 1995b.
- NEWTON, S. M. C- Report of Activities to ANRS, 1995c.
- O'CALLAGHAN, D.; MASKELL, D.; LIEW, F. Y.; EASMON, C. S. F. & DOUGAN, G.- Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attenuation, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c mice. Infect. Immun., **56**: 419-423, 1988.

- O'GOARA, P.; MASKELL, D.; COLEMAN, D.; CAFFERKEY, M. & DOUGAN, G.- Cloning and sequence analysis of the *serC*, *aroA* genes of *Yersinia enterocolitica aroA* mutant. Gene, **84**: 23-30, 1989.
- PFEIFER, J. D.; WICK, M. J.; ROBERTS, R. L.; FINDLAY, K. A; NORMARK, S. J & HARDING, C. V - Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. Nature, **361**: 359-361, 1993.
- POIRIER, T. P.; KEHOE, M. A.; BEACHEY, E. H. J.- Protective immunity evoked by oral administration of attenuated *aroA Salmonella typhimurium* expressing cloned streptococcal M protein. J. Exp. Med., **168**: 25-32, 1988.
- ROBERTS, M.; MASKELL, D.; NOVOTNY, P. & DOUGAN, G.- Construction and characterization *in vivo* of *Bordetella pertussis aroA* mutants. Infect. Immun., **58**: 732-739, 1989.
- ROBERTSSON, J. A.; LINDBERG A. A.; HOISETH, S.; STOCKER, B. A. D.- *Salmonella typhimurium* infection in calves: protection and survival of virulent challenge bacteria after immunization with live and inactivated vaccines. Infect. Immun. **41**: 742-750, 1983.
- ROITT, I. M.- Essential immunology, London, Blackwell, 1994. pp 273-292
- SADOFF, J. C.; BALLOU, W. R.; BARON, L. S.; MAJARIAN, W. R.; BREY, R. N.; HOCKMEYER, W. T.; YOUNG, J. F.; CRYZ, S. J.; OU, J.; LOWELL, G. H.; CHULAY, J. D.- Oral *Salmonella typhimurium* vaccine expressing circumsporozoite protein protects against malaria. Science, **240**: 336-338, 1988.
- SALYERS, A. A. & WHITT, D. D. Bacterial Pathogenesis: a molecular approach. Washington D.C, ASM Press, 1994. pp: 90-96 e 229-243.

- SAMBROOK, J; FRITSH, E. F; MANIATIS, T.- Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd.ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SMITH, B. P.; REINA-GUERRA, M.; HOISETH, S. K; STOCKER, B. A. D.; HABASHA F.; JOHNSON, E. & MERRITT, A.- Safety and efficiency of aromatic-dependent *S. typhimurium* as live vaccine for calves. Am. J. Vet. Res., **45**: 59-66, 1983.
- SMITH, B. P.; REINA-GUERRA, M.; STOCKER, B. A. D.; HOISETH, S. K. & JOHNSON, E.- Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* as modified live vaccines for calves. Am. J. Vet. Res. **45**: 59-66, 1984.
- SRINIVASAN, J.; NAYA, K. A.; CURTISS, R. III.; RUBINO, S.- Effect of the route of immunization using recombinant *Salmonella* on mucosal and humoral immune responses. In: Vaccines 95: Molecular approaches to the control of infectious diseases, Cold Spring Harbor Laboratory, 1995. pp. 60-65.
- STOCKER, B. A. D- Auxotrophic *Salmonella typhi* as live vaccine. Vaccine, **6**: 141-145, 1988.
- STOCKER, B. A. D. & NEWTON, S. M. C.- Immune responses to epitopes inserted in *Salmonella* flagellin. Intern. Rev. Immunol., **11**: 167-178, 1994.
- STRAHAN, K; CHATFIELD, S. N.; TITE, J.; DOUGAN, G. & HORMAECHE, C. E.- Impaired resistance to infection does not increase the virulence of *Salmonella htrA* live vaccines in mice. Microb. Pathog., **12**: 311-317, 1992.
- STUDIER, F. W- Analyses of bacteriophage T4 early RNAs and proteins on slab gels. J. Mol. Biol., **79**: 237-248, 1973.

- TACKET, C. O; HONE, D.H.; LOSONSKY, G. A.; GUERS, L.; EDELMAN, R. & LEVINE, M. M.- Clinical acceptability and immunogenicity of CVD908 *Salmonella typhi* vaccine strain. Vaccine, **10**: 443-446, 1992a.
- TACKET, C. O; HONE, D.H.; CURTISS, R. III.; KELLY, S. M.; LOSONSKY, G. A; GUERS, L.; HARRIS, A. M.; EDELMAN, R. & LEVINE, M. M.- Comparison of the safety and immunogenicity of Δ aroA Δ roC and Δ cya Δ crp *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. Infect. Immun., **60**: 536-541, 1992b.
- VANCOTT, J.L.; STAATS, H. F.; PASCUAL, D. W.; ROBERTS, M.; CHATTFIELD, S. N.; YAMAMOTO, M.; COSTE, M.; CARTER, P. B.; KIYONO, H. & MCGHEE, J.- Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T Helper cell subsets, macrophages, and derived cytokines following oral immunization with live recombinant *Salmonella*. J. Immunol., **156**: 1504-1514, 1996.
- VERJANS, M. G. M.; JANSSEN, R.; UYTDEHAAG, F. G. C. M.; VAN DOORNIK, C. E. M. & TOMMASSEN, J.- Intracellular processing and presentation of T cell epitopes, expressed by recombinant *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, to human T cell. Eur. J. Immunol., **25**: 405-410, 1995.
- VERMA, N. K.; ZIEGLER, H. K.; STOCKER, B. A. D. & SCHOOLNIK, G. K.- Induction of a cellular immune response to a defined T-cell epitope as an insert in the flagellin of a live vaccine strain of *Salmonella*. Vaccine, **13**: 235-244, 1995a.
- VERMA, N. K.; ZIEGLER, H. K.; WILSON, M.; KHAN, M.; SAFLEY, S.; STOCKER, B. A. D. & SCHOOLNIK, G. K- Delivery of class I and class II MHC-restricted T-cell epitopes of listeriolysin of *Listeria monocytogenes* by attenuated *Salmonella*. Vaccine, **13**: 142-150, 1995b.

- VONDERVISZT, F.; UEDAIRA, H.; KIDOKORO, S.-I. & NAMBA, K.- Structural organization of flagellin. J. Mol. Biol., **214**: 97-104, 1990.
- WEI, L. N. & JOYS, T. M.- Covalent structure of three phase-1 flagellar filament proteins of *Salmonella*. J. Mol. Biol., **186**: 791-803, 1985.
- WICK, M. J.; PFEIFER, J. D; FINDLAY, K. A; HARDING, C. V & NORMARK, S. J.- Compartmentalization of defined epitopes expressed in *Escherichia coli* has only a minor influence on efficiency of phagocytic processing for presentation by class I and class II major histocompatibility complex molecules to T cells. Infect. immun., **61**: 4848-4856, 1993.
- WICK, M. J.; HARDING, C. V.; NORMARK, S. J. & PFEIFER, J. D.- Parameters that influence the efficiency of processing antigenic epitopes expressed in *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun., **62**: 4542-4548, 1994.
- WICK, M. J.; HARDING, C. V.; TWESTEN, N. J.; NORMARK, S. J. & PFEIFER, J. D.- The *phoP* locus influences processing and presentation of *Salmonella typhimurium* antigens by activated macrophages. Mol. Microbiol., **16**: 465-476, 1995.
- WU, J. Y.; NEWTON, S. M. C.; JUDD, A.; STOCKER B. A. D. & ROBINSON, W. S.- Expression of immunogenic epitopes of hepatitis B surface antigen with hybrid flagellin proteins by a vaccine strain of *Salmonella*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **86**: 4726-4730, 1989.