UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Clonagem e Expressão da Região Hep do domínio de
Heparina da Proteína Hemaglutinina Filamentosa (FHA) da
bactéria *Bordetella pertussis* em sistemas heterólogos

Débora Colombi

TESE DE DOUTORADO

Paulo Lee Ho

**São Paulo
2003**

“ Clonagem e Expressão da Região Hep do Domínio de
Heparina da Proteína Hemaglutinina Filamentosa (FHA) da
Bactéria *Bordetella pertussis* em Sistemas Heterólogos ”

DÉBORA COLOMBI

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.

Aprovada por:

Prof. Dr. PAULO LEE HO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
IQ – USP

Prof. Dr. SHAKER CHUCK FARAH
IQ – USP

Prof. Dr. LUIZ CARLOS DE SOUZA FERREIRA
ICB - USP

Profa. Dra. SYLVIA LUISA PINCHERLE CARDOSO LEÃO
UNIFESP

SÃO PAULO
17 DE MARÇO 2003.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

Dedico esta tese ao meu filho, Lucas.

"Nesta vida, pode-se aprender três coisas de uma criança:
estar sempre alegre, nunca ficar inativo
e chorar com força por tudo o que se quer".

(Paulo Leminski)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Lee Ho pela orientação e ao Paulinho pela compreensão e amizade nos momentos difíceis que enfrentei.

A Ana Lucia do Tabet Oller do Nascimento e Luciana Cezar de Cerqueira Leite pelo uso de equipamentos e pelo empréstimo de materiais.

A Dra. Denise Silvia Piccini Quintas Horton pela inestimável ajuda com a purificação da proteína FHA e no ensaio de aglutinação de eritrócitos.

A Dra. Waldely de Oliveira Dias pela ajuda com as imunizações e por disponibilizar os anticorpos anti-FHA e anti-PT.

Ao Dr. Wagner Quintilio pela realização do desafio intra-cerebral.

A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

Aos colegas do Laboratório, Celso, Patrícia, Inácio, Angelina, Álvaro, Jane, Úrsula, Fernanda, Ingrid, Érika, Emília, Monique, especialmente a minha colega de bancada Ana Paula Arêas, ao pessoal do Genoma e do BCG; Eliane, Paula, Soraia, Daniela, Ivana, Ivan, o Leo, Karina, Marcias, Beth, entre tantos outros que devo estar esquecendo de citar.

Ao pessoal do Laboratório do Paulo em Botucatu.

Aos camundongos que contribuíram com a própria vida para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus grandes amigos que sempre me apoiaram, alguns mesmo a longa distância, Cintia, Adriana, Kátia, Lucia, Maria Elisa, Marcelo, Teresa, Aninha, um abraço especial ao povo da Paulista que já fizemos 10 anos de formados; Aguinaldo, Bilu, Catia, Lucy, Denise (estamos ficando velhos, hein?).

Um agradecimento mais do que especial a minha grande amiga e colega de Laboratório, Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira ou simplesmente Leo, que foi de imensa ajuda principalmente nos últimos meses desta tese, ajuda que jamais serei capaz de agradecer o suficiente.

A minha família, Izabel, Julio, Monica, Eduardo, Fernando, Marcio, Luiz Felipe, Guilherme pelo eterno apoio e por sempre estarem ao meu lado nos momentos difíceis e inesquecíveis destes últimos cinco anos.

Não podia deixar de agradecer ao revezamento de cuidar do Lucas para que eu pudesse finalizar esta tese, a minha irmã e madrinha do Pequeno, meu irmão Du, até o meu pai entrou na dança e principalmente a minha mãe, que foi de uma inestimável ajuda e paciência, pois enquanto meu filho estava com ela, podia trabalhar tranquila, pois sabia que ele estava em ótimas mãos.

Ao meu marido e eterno amigo e companheiro, Paulo, por sempre me incentivar e acreditar em mim. Por jamais ter reclamado das idas e vindas de Botucatu e por ficar longe do filho para eu pudesse terminar esta tese. Mas principalmente pelo amor, carinho, paciência e por ter me dado o maior presente, o Lucas.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
ABREVIATURAS	iii
I – INTRODUÇÃO	01
Vacinas contra <i>Bordetella pertussis</i>	04
Expressão de antígenos recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	07
Vacina de DNA	07
TAP EXPRESS ("The Power of Transcriptionally Active PCR")	09
Lactobacilos	10
Lactobacilos como vetores para vacinação oral	12
O operon da lactose (<i>lacTEGF</i>) do <i>Lactobacillus casei</i> ATCC393 [pLZ15]	13
II – OBJETIVOS	15
III – MATERIAIS E MÉTODOS	16
1. Vetores de clonagem e expressão	16
2. Preparação de DNA genômico de <i>Bordetella pertussis</i>	16
3. Reação de polimerase em cadeia (PCR)	16
4. Rápida preparação de DNA para seleção de clones recombinantes	19
5. Isolamento de DNA de plasmídeo em pequena escala	19
6. Digestão	20
7. Eletroforese em gel de agarose	20
8. Purificação de fragmento de DNA em gel de agarose	20
9. Ligaçao	21
10. Obtenção de células competentes	21
11. Experimento de transformação	22
12. Experimento de indução protéica e análise em gel de SDS-PAGE	22
13. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS	22
14. Purificação da proteína recombinante em coluna de níquel (NiSO ₄)	23
14.1. Sobrenadante da lise das bactérias	23
14.2. Precipitado da lise das bactérias	23
15. Purificação da proteína recombinante em coluna de Heparina-Sepharose	24
16. Obtenção dos antisoros	24
17. ELISA	25
18. Western-blot	25
19. TAP EXPRESS (Gene Therapy System)	26
19.1.1. Desenho do oligonucleotídeo 5' ("forward")	26
19.1.2. Desenho do oligonucleotídeo 3' ("reverse")	26

19.2. Primeiro PCR	27
19.3. Segundo PCR	27
20. Transfecção de DNA	28
21. Experimento de Desafio com <i>Bordetella pertussis</i>	29
21.1. Cronograma do Experimento de Desafio	29
21.2. Imunização	29
21.2.1. Injeção de Cardiotoxina	29
21.2.2. Injeção de DNA e/ou Proteína	29
21.3. Desafio com <i>Bordetella pertussis</i>	30
22. Purificação de FHA	30
22.1. Cromatografia de Afinidade em “Cellufine Sulfate” (Amicon)	30
22.2.1. Cromatografia de afinidade – Coluna fetuína-sepharose	30
22.2.2. Gel Filtração	31
22.3. ELISA “sandwich”	31
23. Ensaio de Hemaglutinação	32
24. Lactobacilos	32
24.1. Amplificação da Região de Interesse	32
24.2. PCR de colônias	32
24.3. Preparação de DNA plasmidial de lactobacilos	33
24.4. Transformação de Lactobacilos por eletroporação	33
24.4.1. Preparação da amostra	33
24.4.2. Preparação de lactobacilos competentes	33
24.4.3. Eletroporação	34
24.5. Indução da expressão em <i>Lactobacillus casei</i>	34
24.6. Imunização	34
IV – RESULTADOS	36
1. Domínio de ligação à Heparina da proteína FHA de <i>Bordetella pertussis</i>	36
2. Expressão de antígenos recombinantes em <i>Escherichia coli</i> .	36
2.1. REGIÃO MAL80	38
2.1.1. Amplificação, clonagem, expressão e purificação da região MAL80 do domínio de ligação à Heparina da proteína FHA de <i>Bordetella pertussis</i>	38
2.2. REGIÃO HEP	42
2.2.1. Amplificação, clonagem, expressão e purificação da região HEP do domínio de ligação à Heparina da proteína FHA de <i>Bordetella pertussis</i>	42
2.2.2. Produção e caracterização de anticorpos anti-HEP	44
2.2.2.1. Ensaio de reatividade cruzada	44
2.2.2.1.1. ELISA	44
2.2.2.1.2. Western-blot	49
3. Purificação da FHA	49
4. Caracterização da região Hep	52

4.1. Afinidade da região Hep por Heparina	52
4.2. Ensaio de Hemaglutinação	52
5. TAP EXPRESS	52
5.1. Amplificação dos domínios de ligação à Heparina de FHA e da subunidade S1 da toxina pertússica (PT) de <i>B. pertussis</i>	56
5.2. Transfecção de DNA	56
5.3. Obtenção de antisoro	56
6. Experimento de Desafio	56
7. Lactobacilos	60
7.1. Amplificação e clonagem do domínio Heparina da proteína FHA de <i>B. pertussis</i> em Lactobacilos	60
7.2. Expressão	66
7.2.1. Expressão intracelular	66
7.2.2. Expressão extracelular	66
7.3. Obtenção de antisoro	66
8. Ensaio de inibição de hemaglutinação	66
V - DISCUSSÃO	71
VI - CONCLUSÕES GERAIS	83
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
VII – CURRICULUM VITAE	95

RESUMO

Bordetella pertussis, o agente etiológico da coqueluche ou tosse comprida, que estabelece a infecção através da fixação bacteriana no epitélio do trato respiratório superior. Os principais mediadores de adesão da bactéria são a toxina pertússica (PT) e a hemaglutinina filamentosa (FHA).

A FHA é a adesina majoritária e contém pelo menos 4 domínios: porção N-terminal, domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) (FHA₁₁₄₁₋₁₂₇₉), trinca de aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) (FHA₁₀₉₇₋₁₀₉₉) e o sítio de ligação a heparina (domínio Hep) (FHA₄₄₂₋₈₆₃).

Neste trabalho, foi realizado a amplificação de duas regiões do domínio de ligação à heparina, as regiões MAL80 (FHA₂₉₉₋₈₇₃) e HEP (FHA₄₃₀₋₈₇₃). As regiões foram amplificadas, clonadas no vetor de expressão pAE, expressas utilizando a cepa BL21 SI de *E. coli* e purificadas. A proteína HEP purificada de *E. coli* possui baixa afinidade por heparina e não é capaz de aglutinar hemácias.

A proteína recombinante HEP purificada foi utilizada para a produção de anticorpos. Através do experimento de ELISA foi demonstrado que o anti-soro anti-HEP é capaz de reconhecer além da região HEP, a região MAL80 e a proteína FHA. Estes resultados foram confirmados por experimentos de Western.

Neste período também foi realizada a amplificação do domínio HEP de FHA e da subunidade S1 da toxina pertússica (PT) de *B. pertussis* através do método de TAP *Express*. Este método envolve duas reações de PCR e no final do processo é obtido um fragmento que contém uma região promotora (CMV), uma sequência codificadora e uma região terminadora (SV40), que está pronto para ser introduzido e expresso em animais. De posse deste material e da proteína recombinante HEP, foi realizado o desafio intracerebral com *Bordetella pertussis* e através do monitoramento dos camundongos foi observado que nenhum dos candidatos testados foi capaz de proteger os animais contra *B. pertussis*.

Foi realizado também a expressão do domínio Hep em lactobacilos, visando um possível sistema de imunizações de mucosas.

Os anticorpos produzidos nos camundongos imunizados com a proteína HEP expressa em *E. coli*, lactobacilos e por vacina de DNA foram capazes de inibir a hemaglutinação promovida pela proteína FHA.

ABSTRACT

Bordetella pertussis, the agent of whooping cough, establishes infection by attaching to the ciliated epithelial cells of the respiratory tract. The bacterial adherence is mediated by pertussis toxin and filamentous hemagglutinin (FHA).

FHA is the major adhesin of *B. pertussis* and displays multiple adherence activities. FHA contains four distinct domains that exhibit specific affinities for different ligands or receptor, the amino-terminal end, the RGD triplet (FHA₁₀₉₇₋₁₀₉₉), the lectin domain (FHA₁₁₄₁₋₁₂₇₉) and the heparin-binding domain (FHA₄₄₂₋₈₆₃).

In this study, two overlapping regions of the heparin-binding domain, Mal80 (FHA₂₉₉₋₈₇₃) and Hep (FHA₄₄₂₋₈₇₃), were amplified by PCR and subcloned in pAE expression vectors for *E. coli*. The fusion proteins in pAE were transformed in *E. coli* BL21 SI, induced with NaCl 0,3 M and purified using a nickel-charged metal chelating resin. The purified protein has low heparin affinity and does not have hemagglutination activity.

The purified protein HEP was used to produce polyclonal antibodies in mouse. The anti-HEP antibodies are able to recognize the HEP, MAL80 and FHA proteins in ELISA and western assays, but anti-FHA only recognized the FHA protein.

The genetically detoxified S1 subunit of pertussis toxin and Hep domain were amplified by the TAP Express method. There are two PCR reactions involved in the TAP process. At the end of the process the fragment of interest will carry a CMV promoter and a SV40 terminator and is ready to be introduced into animals or cell by transfection.

Groups were immunized with proteins and/or DNA, challenged i.c. with a lethal dose of live *Bordetella pertussis* and the survival was monitored. No groups were protected against the challenge.

The recombinant protein HEP were also expressed in *Lactobacillus* aiming the development of potential mucosal vaccines.

The polyclonal antibodies produce in mouse immunized with DNA and protein Hep expressed in *E. coli* and *Lactobacillus* were able to inhibition the FHA hemagglutination activity.

ABREVIATURAS

A – absorbância
aa - aminoácidos
Ac - anticorpo
Amp - ampicilina
BCIP - 5-bromo-4-cloro -3-indolyl-fosfato
BSA – albumina sérica bovina
cDNA - DNA complementar (*complementary DNA*)
CFU – unidade formadora de colônia
CMV - Citomegalovírus
Cols. - colaboradores
CRD - domínio de reconhecimento de carboidrato
D.O. - Densidade Óptica
DMSO – dimetil sulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucléico
dNTPs – deoxinucleotídeos trifosfato
DTP – vacina tríplice
EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA – ensaio de adsorção imuno-enzimático
FHA – hemaglutinina filamentosa
FUNASA – Fundação Nacional da Saúde
gDNA - DNA genômico (*genomic DNA*)
GFP – *green fluorescent protein*
HIV – vírus da imunodeficiência adquirida
i.m. – imunização intramuscular
i.p. – imunização intraperitoneal
Ig - imunoglobulina
IPTG – isopropil tio β -galactosídeo
Kb – quilo pares de bases (mil pares de bases)
kDa – quilo Dalton

LB – meio de cultura Luria - Bertani
MBP – proteína básica de mielina
mRNA – RNA mensageiro
NBT - nitroblue tetrazolium
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPD - o-phenilediamina dihidroclorato
p.e. – por exemplo
pb – pares de bases
PBS – solução salina tamponada por fosfato (*phosphate buffer saline*)
PCR – reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)
PDB – *protein data bank*
PM – massa molecular
PMSF – fenilmetil-sulfonil fluoridrato
PT – toxina pertússica
RNA – ácido ribonucléico
rpm – rotações por minuto
s.c. – imunização subcutânea
SDS – dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB – soro fetal bovino
TA – temperatura ambiente
TAE – tampão tris acetato EDTA
TE – Tris-EDTA
Tris – tris (hidroximetil) amino metano
tRNA – RNA transportador

I - INTRODUÇÃO

A coqueluche é uma doença infecto-contagiosa do trato respiratório que compromete especificamente o aparelho respiratório (traquéia e brônquios) e se caracteriza por paroxismos de tosse seca. Apesar de ser conhecida desde a Idade Média, a doença só foi descrita em 1578 por Guillaume de Baillou (Holmes, 1940) devido a uma epidemia ocorrida em Paris.

A transmissão, na maioria dos casos, é dada pelo contato direto com o infectado, através das gotículas de secreção da orofaringe eliminadas por tosse, espirro ou fala e pode ocorrer também pelo contato com objetos recentemente contaminados com as secreções do doente.

É uma doença de distribuição geográfica universal, e sua incidência independe de raça, clima ou cultura. O período de incubação varia de sete a quatorze dias e depois evolui em três fases sucessivas:

Fase Catarral: Período mais contagioso, com duração de uma ou duas semanas, é caracterizada por manifestações respiratórias e sintomas leves como febre um pouco intensa, mal-estar geral, coriza e tosse seca, seguida de surtos de tosse cada vez mais intensos e freqüentes.

Fase Paroxística: Com duração de duas a seis semanas, apresenta como manifestação típica os paroxismos de tosse seca, sendo finalizados por inspiração forçada, súbita e prolongada, acompanhada de um ruído característico; o guincho, seguido de vômitos.

Fase de Convalescença: Os paroxismos de tosse desaparecem e dão lugar a episódios de tosse comum. Essa fase pode persistir durante mais algumas semanas.

As principais complicações da doença podem ser respiratórias (pneumonia, ativação de tuberculose latente, enfisema, ruptura de diafragma, otite média, etc); neurológicas (encefalopatia aguda, convulsões, coma, hemorragias intracerebrais, estrabismo, surdez, etc); nutricionais (desidratação e/ou desnutrição devido a vômitos freqüentes pós-crise e perda de peso) e outros como edema da face, úlcera do frênulo lingual, hérnias (umbilicais, ingüinais e diafragmáticas), conjuntivite e infecções secundárias.

Dados da OMS (Organização Mundial da Saúde) de 1999 estimam que ocorram no mundo cerca de 20 a 40 milhões de casos, além de 200 a 400 mil óbitos pela doença por ano (WHO, 1999).

No Brasil, no período 1981 – 1991, foram notificados uma média de 36.173 casos por ano. A partir de então, os casos foram decrescendo paulatinamente, sendo que em 1999 foram relatados 1369 casos, em 2000, 2464 casos e em 2001, 1464 (FUNASA 2002). A mortalidade no Brasil em 2001 foi de aproximadamente 0,08 por 100.000 habitantes. A letalidade da doença tem importância mais acentuada no grupo de crianças menores de seis meses, onde se concentram cerca de 50% dos óbitos por coqueluche. (FUNASA 2002).

O agente etiológico da coqueluche, *Bordetella pertussis*, foi identificado em 1900 e isolado em 1906 por Bordet e Gengou. O gênero *Bordetella* é constituído de cocobacilos gram-negativos, dos quais os mais conhecidos são: *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*. A *B. pertussis* é o agente etiológico da coqueluche ou tosse comprida. A *B. parapertussis* causa uma infecção respiratória semelhante à coqueluche, entretanto é menos grave, pois o paciente não apresenta o quadro de tosse paroxística, enquanto que a *B. bronchiseptica* é patogênica apenas para animais.

A *Bordetella pertussis* é um cocobacilo gram-negativo, aeróbio, imóvel, não esporulado e provido de fímbrias, sendo que a forma virulenta é capsulada.

O homem é o único reservatório natural de *Bordetella pertussis*, não tendo sido demonstrada a existência de portadores assintomáticos crônicos. A *Bordetella pertussis* sobrevive fora do hospedeiro humano apenas por períodos curtos, sendo destruído em meio seco, luz ultravioleta e a altas temperaturas (50 a 55 °C).

Após a infecção, o microorganismo adere à superfície epitelial da traquéia e dos brônquios, onde se multiplica rapidamente e interfere com a ação ciliar (Weiss & Hewlett, 1986). As bactérias liberam toxinas e substâncias que irritam as células superficiais, provocando tosse e linfocitose pronunciada, podendo ocorrer necrose de partes do epitélio e infiltração polimorfonuclear, com inflamação peribrônquica e pneumonia intersticial. Não invade a corrente sanguínea e não infecta as células da submucosa, sendo sua destruição dificultada pela sua capacidade de entrar e sobreviver no interior de macrófagos (Friedman e cols., 1992).

A entrada do agente infeccioso no hospedeiro e a subsequente adesão no tecido alvo é crucial nos primeiros passos do processo de infecção. A colonização do hospedeiro pelo patógeno depende desta fase de adesão que é mediada por proteínas microbiais expostas na superfície denominada de adesinas. A produção das adesinas é normalmente regulada e coordenada a nível genético e estas podem ser consideradas importantes fatores de virulência (Finlay & Falkow, 1989).

A patogenicidade de *B. pertussis* envolve diversas adesinas e toxinas. Entre as toxinas, as mais conhecidas são a toxina pertússica, toxina adenilato-ciclase, citotoxina traqueal e toxina dermonecrótica (Wilson e cols., 1998). Entre as adesinas, já foram descritas duas com estruturas filamentosas, a hemaglutinina filamentosa (FHA) e a fimbriae (Robinson e cols., 1990); e outras proteínas não filamentosas, como toxina pertússica (PT) e uma proteína da membrana externa de 69 kDa chamada pertactina (Leininger e cols., 1991 e Weiss & Hewlett, 1986). A FHA e PT atuam como os principais mediadores de adesão da bactéria (Tuomanen & Weiss, 1985).

A sequência primária da Toxina pertússica (PT) foi deduzida por clonagem e sequenciamento de seu gene estrutural (Locht & Keith, 1986 e Nicosia e cols., 1986). A PT é composta de 5 proteínas (S1 a S5), sendo que o domínio enzimaticamente ativo está na proteína S1 e as demais (S2 a S5) subunidades assumem a conformação para a formação do domínio de ligação (Barbieri e cols. 1987; Nicosia e cols., 1987 e Locht e cols., 1987). A PT é uma proteína de aproximadamente 105 KDa formada de subunidades A (proteína S1) e B (proteínas S2-S5), que além de participar na fixação, também possui uma atividade de ADP-ribosilação de proteínas G inibindo sua ligação aos receptores intracelulares (Ui, 1998) e promove a linfocitose (Meade e cols., 1984).

A FHA parece ter um papel fundamental na fixação bacteriana no epitélio do trato respiratório superior (Kimura e cols., 1990; Relman e cols., 1989 e Tuomanen & Weiss, 1985). É uma proteína de 220 kDa (Locht e cols, 1993 e Makhov e cols., 1994) que é sintetizada na forma precursora de 367 kDa (FhaB) e translocada para o periplasma (Domenighini e cols., 1990). A região N-terminal da FhaB interage com uma proteína presente na membrana externa (FhaC) e é exportada para fora da membrana (Arico e cols., 1993; Jacob-Dubuisson e cols 1996 e Renauld-Mongénie e cols., 1996). Durante este processo, a região

carboxi-terminal de FhaB é exposta e clivada por proteases presentes no periplasma, gerando a proteína madura FHA.

A FHA possui pelo menos 4 domínios caracterizados:

01. porção N-terminal
02. trinca de aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD)
03. domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD)
04. sítio de ligação à heparina

A porção N-terminal da molécula está envolvida na atividade de hemaglutinação dependente de carboidrato (Leininger e cols., 1990; Sandros e Tuomanen, 1993). A região que contém a trinca RGD (aminoácidos 1097-1099) interage com a integrina CR3 presente nos macrófagos pulmonares (Locht e cols., 1993; Relman e cols., 1989 e 1990; Sandros & Tuomanen, 1993 e Saukkonen e cols., 1991). O domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), que é constituído por 139 resíduos (aminoácidos 1141-1279), é único em sua afinidade por glicolipídeos e também pelas células ciliadas (Prasad e cols., 1993 e Liu e cols., 1997).

O sítio de ligação de heparina, que possui 422 resíduos (aminoácidos 442-863) (Hannah e cols., 1994) parece ser responsável pela ligação de FHA aos glicolipídeos sulfatados presentes sobre a superfície das células epiteliais (Menozzi e cols., 1994). A heparina é um potente inibidor de aglutinação de eritrócitos induzida por FHA. Como a heparina é estruturalmente relacionada ao heparan-sulfato encontrado na matriz extracelular e na superfície de muitas células epiteliais, a interação *B. pertussis*-célula epitelial pode ser mediada por FHA via heparan-sulfato ou outros glicosaminoglicanos sulfatados.

Vacinas contra *Bordetella pertussis*

A primeira vacina desenvolvida contra a coqueluche era composta de bactérias inteiras mortas e foi testada em 1920 na Ilha de Faroe onde estava ocorrendo uma epidemia da doença (Madsen, 1933). A vacinação demonstrou alguma proteção, mas era mais eficiente em reduzir a severidade da doença do que prevenir. Além disso, foi relatado alto número de reações adversas em crianças. Com isso havia uma grande controvérsia, se a vacina deveria ser usada com uso profilático ou terapêutico (Lapin, 1943). No entanto, em 1930 ficou

comprovado que a vacina provia uma significativa proteção na aquisição da doença (Kendrick & Eldering, 1939).

Entretanto, não havia como comparar a eficiência das vacinas produzidas nos diferentes laboratórios. Em resposta a este problema, em 1947 Kendrick e colaboradores desenvolveram um desafio intracerebral (i.c.) em camundongos utilizando uma cepa virulenta, a cepa 18323. Em 1960, estudos realizados pelo Conselho de Pesquisa Médico Britânico concluiu que a resposta ao desafio intracerebral correlacionava com a proteção da doença nas crianças (Medical Research Council, 1956 e 1959). Com bases nestes resultados, o desafio intracerebral é usado atualmente para quantificar a potência da vacina no mundo inteiro, sendo este o teste aceito pela OMS para este fim (WHO, 1964).

Apesar da vacina ser bastante eficiente, como podemos observar no quadro abaixo, esta apresentava alguns problemas como a grande variabilidade da eficácia da vacina (10 – 100%) em função do tipo de preparo (Fine & Clarkson, 1987), duração limitada de proteção (até 12 anos) (Lambert, 1965) e a grande quantidade de reações adversas (Cherry e cols., 1988; Sato e cols., 1991; Golden, 1990 e Walker e cols. 1988). Devido a estes fatores, começaram as tentativas de produzir uma vacina alternativa, que diminuísse a presença de produtos bacterianos como a endotoxina da parede das bactérias, e conseqüentemente diminuísse os efeitos colaterais.

Impacto da vacinação nos EUA		
Antes da vacinação	175 mil casos / ano	150 casos/100 mil habitantes
1980 a 1990	2900 casos / ano	1 caso / 100 mil habitantes
WHO 1999		

Na Década de 70, alguns países como Japão, Itália, Suécia e Alemanha Ocidental, interromperam a vacinação contra a coqueluche devido a alguns fatores como: dúvida sobre a eficácia da vacina triplice DTP (difteria, tétano e coqueluche), pois acreditavam que o declínio da doença era decorrência da melhora da condição de vida da população e não devido a vacinação; o incômodo gerado pelos efeitos colaterais da vacina como febre, irritabilidade, choro persistente, sonolência, edema e dor; a preocupação com os efeitos colaterais

graves da vacina, como choro incontrolável, febre alta e convulsão e a dúvida se a vacina causava a Síndrome da morte súbita e problemas neurológicos permanentes como a encefalopatia.

No Japão, devido à preocupação com os eventos adversos e a pressão pública após duas mortes associadas temporariamente a vacina, as autoridades japonesas resolveram interromper o Programa Nacional de Imunização contra a coqueluche em 1975 e foi observado um grande aumento no número de casos. Com a vacinação ocorreram 3 óbitos em 12 milhões de habitantes nos anos de 1971 a 1975 quando ocorreu a interrupção da vacinação, e então em 1979, ocorreram 13100 casos com 41 óbitos (Kimura & Kuno-Sakai, 1990 e Noble e cols., 1987).

Em 1981 foi licenciada no Japão a primeira vacina acelular, que era composta da toxina pertússica por se tratar de um dos principais fatores de virulência da bactéria e por ser indutora de proteção e da FHA. Houve então a reintrodução da imunização contra a coqueluche no Japão, diminuindo a mortalidade para zero em 1990 (Kimura & Kuno-Sakai, 1990).

Hoje em dia já existem várias vacinas acelulares que diferem entre si no número de componentes, quantidade de cada componente, processo de produção, grau de purificação dos componentes, tipo de conservante e combinação com outras vacinas. Tendo em vista as vacinas existentes podemos concluir que a PT é um componente essencial e que a adição de FHA melhora a eficácia da vacina (Brennan e cols., 1992, Brennan & Shanin, 1996 e Jadhav & Gairola, 1999).

No Brasil, a vacina contra a coqueluche é ministrada nos recém nascidos por três vezes, a partir dos dois meses de idade, com intervalo de dois meses entre as doses (isto é, aos 2, 4 e 6 meses). O primeiro reforço deve ser aplicado doze meses após a última dose (1 ano e seis meses) e o segundo reforço após dezoito meses do primeiro (3 anos). Esta vacina é igualmente administrada em combinação com toxóides diftéricos e tetânicos (DTP).

A vacina contra *B. pertussis* atualmente produzida no Brasil consiste de células inteiras inativadas por tratamento com formalina a 56° C por 30 minutos. O Brasil não produz vacina acelular contra a coqueluche, mas existem quatro vacinas acelulares sob a forma de vacina tríplice licenciadas no Brasil (FUNASA 2002).

Expressão de antígenos recombinantes em *Escherichia coli*

O sistema de expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* é um sistema eficiente de expressão que vem sendo amplamente utilizado em vários laboratórios.

O vetor pAE possui uma seqüência que codifica para seis histidinas antes do sítio de clonagem, utiliza o promotor do fago T7 e foi desenvolvido em nosso laboratório. O vetor utilizado neste projeto (Fig. 01) possui o cDNA da proteína Sm14 (pAE-Sm14), que codifica para um antígeno de *Schistosoma mansoni* (Ramos e cols., 2003 e resultados não publicados e Junqueira de Azevedo e cols. 2001). As clonagens foram realizadas por substituição do Sm14 pelo fragmento de interesse. Desta forma, a proteína expressa poderia ser em tese, facilmente purificada por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de Níquel-Sepharose.

A construção de interesse foi expressa na linhagem da cepa de *E. coli* BL21SI que contém o gene da T7 RNA polimerase integrado no genoma da *E. coli* sob o controle do promotor *proU*. A cepa BL21SI usa a osmolaridade para regular a expressão de proteínas. Esta cepa é derivada da cepa GJ1158, que é induzida por sal (Bhandari & Gowrishankar, 1997). A BL21SI contém o gene da polimerase T7 RNA integrada (Studier e cols., 1990) sobre o controle do promotor *proU* que é induzido por sal (Gowrishankar, 1985). Quando a célula é submetida a uma alta osmolaridade (p.e. NaCl 0,3 M), a expressão da T7 RNA polimerase é induzida pelo promotor *proU*.

Vacina de DNA

As vacinas de DNA possuem diversas vantagens como o baixo custo de produção e estabilidade. A imunização mediada por DNA é baseada na introdução de um plasmídeo capaz de codificar uma proteína antigênica nas próprias células do indivíduo imunizado.

A indução da resposta imune pela injeção de um plasmídeo contendo um gene repórter sob controle de promotores eucariontes fortes na ausência de adjuvante foi demonstrada pela primeira vez por Tang e colaboradores (1992).

Nde I Xho I BamHI
 CAT ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC CTC GAG GGA TCC
 Met Região de poli histidina

Hind III
 GTC ATG Sm14 AAG CTT
 Met

Figura 01 – Mapa de restrição do vetor de clonagem e expressão pAE-Sm14.

A introdução do DNA pode ser realizada através da injeção intramuscular ou intradérmica. A via de inoculação parece ser um determinante na indução da resposta imune, havendo ainda a possibilidade de lesão do músculo por toxinas, o que levaria à melhoria da resposta devido ao aumento de expressão causado pela regeneração do tecido ou pelo recrutamento de células apresentadoras de antígeno. A resposta imune induzida pelo DNA envolve resposta celular e na maior parte dos casos, uma forte resposta humoral também é observada. O exato mecanismo de imunização por vacinas de DNA não está completamente estabelecido, já que não se sabe se outras células, além das células musculares, seriam primariamente transformadas com o DNA. Posteriormente, as proteínas sintetizadas teriam fácil acesso a células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas intersticiais, induzindo uma forte resposta imune após processamento pelas vias MHC I e MHC II. A indução de resposta humoral e celular representa uma grande vantagem sobre vacinas convencionais que induzem prioritariamente resposta celular após a expressão endógena do antígeno com a imunização com vírus vivos e atenuados, e resposta humoral após vacinação com proteínas, polissacarídeos e organismos inativos.

Vacinas de DNA já foram testadas contra vírus, bactérias, protozoários, helmintos e micoplasma e existe também a possibilidade de utilização no tratamento de alergia, neoplasia e autoimunidade. Em diversos casos, proteção contra a infecção pelo patógeno também foi demonstrada. A maioria dos trabalhos envolvem o desenvolvimento de vacinas contra vírus, como influenza A, HIV, e hepatite B (Lai & Bennett, 1998). O modelo de influenza A foi o primeiro a demonstrar a eficácia de uma vacina de DNA, com a indução de proteção cruzada contra duas linhagens distintas de vírus (Ulmer e cols., 1993). Vacinas de DNA contra patógenos bacterianos já foram desenvolvidas contra *Mycobacterium tuberculosis* (Lowrie e cols., 1997), *Salmonella typhi* (Lopez-Macias e cols., 1996) e *Clostridium tetani* (Anderson e cols., 1996).

TAP EXPRESS (“Transcriptionally Active PCR”)

Este método está baseado no princípio de que um produto de PCR recombinante que contém um promotor, uma sequência codificadora e um sinal de terminação que pode ser introduzido e efetivamente expresso em células de mamíferos. Com a utilização do “Tap Express” não existe a necessidade de clonar

o gene de interesse nos plasmídeos, nem de transformar ou purificar os plasmídeos, com a vantagem de se obter níveis do produto iguais aos plasmídeos convencionais. Trata-se de um método rápido e simples, pois com apenas duas reações de PCR já seria possível obter o produto final (Fig. 02). Para a obtenção do produto final a ser utilizado para a imunização, são necessários alguns passos. Primeiramente, o gene de interesse é ligado a oligonucleotídeos contendo seqüências específicas referentes a região promotora (5') e região terminadora (3'). Para realizar esta ligação, o gene de interesse é submetido à PCR na presença de dois oligonucleotídeos híbridos. Após este passo, o produto é ligado, através de um segundo PCR, à uma região promotora (promotor modificado do CMV, 800 pb) e uma região terminadora (terminador SV40 modificado, 200 pb). O produto agora está apto a ser injetado em camundongos para a produção de anticorpos.

Lactobacilos

Lactobacilos são bactérias Gram-positivas que fazem parte da flora microbiana de adultos saudáveis, que proliferam em cavidades corpóreas como o trato gastrointestinal e urogenital. Os lactobacilos possuem três atividades probióticas, isto é, atividades que exercem efeito benéfico ao hospedeiro quando ingerido vivo.

A primeira atividade está relacionada com a digestão da lactose em indivíduos com deficiência congênita em lactase; apesar do mecanismo ainda não estar definido, os lactobacilos podem agir estimulando a mucosa intestinal do hospedeiro a produzir lactase endógena ou suplementando a deficiência de lactase do hospedeiro. A segunda atividade é a defesa do hospedeiro de contaminações digestivas causadas por bactérias patogênicas, estimulando respostas imunológicas e funcionando como uma barreira protetora a outros microrganismos. Por fim, certas linhagens de lactobacilos possuem atividades adjuvantes que estimulam a resposta imunológica do hospedeiro contra antígenos (Perdigon e cols., 1995). Um exemplo é a capacidade do *Lactobacillus casei* de estimular a resposta imunológica de crianças vacinadas por via oral contra o rotavírus (Isolauri e cols., 1995).

Figura 02 – Esquema do “TAP Express”.

Por serem bactérias consideradas seguras, classificadas como “food grade”, os lactobacilos são bons candidatos para aplicações em terapias orais. Desta forma, eles poderiam ser utilizados, por exemplo, como vetores na introdução de enzimas deficientes no hospedeiro. Uma outra aplicação seria a utilização de lactobacilos recombinantes, carregando antígenos de diferentes patógenos, na indução de resposta imune no hospedeiro, funcionando desta forma como vacinas vivas (Dougan, 1994).

Para estes fins, o desenvolvimento de sistemas de expressão e secreção de proteínas heterólogas em lactobacilos tem sido extensivamente explorado nos últimos anos. O efeito dos diferentes sistemas de expressão e das diferentes linhagens na indução de resposta imune ou tolerância também tem sido objeto de estudo de vários grupos (Gerritse e cols., 1990 e Maasen e cols., 1999).

Lactobacilos como vetores para vacinação de mucosas

As vacinas contra infecções de mucosas das vias aéreas, trato digestivo, urinário e reprodutor, entre outras, devem estimular o sistema imune de mucosas, particularmente através da produção de IgA. Para tanto, a imunização por via oral é mais eficaz em relação à imunização parenteral. Além disso, a imunização via oral apresenta vantagens em relação à facilidade de aplicação, podendo diminuir o custo de vacinação de populações. Apesar da indução de IgA em mucosas e secreções, a resposta de anticorpos sistêmicos é geralmente moderada, provavelmente devido ao processo digestivo que pode levar à perda do potencial imunogênico do antígeno. Neste caso, a utilização de adjuvantes é necessária para induzir e aumentar a resposta imune (Gerritse e cols., 1990).

Entretanto, a indução de resposta imune de mucosas não é um evento simples, devido à possibilidade de desenvolvimento de tolerância, um fenômeno caracterizado pela falta ou diminuição da resposta imune a determinado antígeno.

Nos últimos anos, alguns estudos têm mostrado a indução de resposta imune ou tolerância (Perdigon e cols., 1995; Powels e cols., 1996 e Perdigon e cols., 1999) por antígenos associados a lactobacilos.

Com o intuito de analisar melhor o tipo de resposta induzido, Maassen e colaboradores construíram diferentes vetores de expressão direcionando a localização do antígeno para a superfície de lactobacilos ou secreção para o meio. Através deste sistema eles propõem a análise da indução de resposta

protetora, utilizando o fragmento C de toxina tetânica, ou tolerância utilizando a proteína básica de mielina (MBP) (Maassen e cols., 1999).

Além da localização do antígeno, a indução de diferentes citocinas parece variar com a linhagem de lactobacilos administrada, variando assim o tipo de resposta (Maassen e cols., 1998). A indução de resposta imune contra o fragmento C da toxina tetânica, pode ser potenciada através da utilização de uma linhagem de *Lactococcus lactis* capaz de secretar as interleucinas 2 e 6 (Steidler e cols., 1998).

Na busca de vacinas orais eficazes, diferentes linhagens de lactobacilos têm sido utilizadas atualmente para a expressão de proteínas heterólogas como a subunidade B da toxina colérica (Slos e cols., 1998), o antígeno protetor do *Bacillus anthracis* (Zegers e cols., 1999) e o fragmento C da toxina tetânica (Maassen e cols., 1999). Estudos mais recentes mostraram pela primeira vez a indução de resposta imune protetora contra tétano em camundongos, através do aumento de IgG sistêmica, após imunização nasal com *Lactobacillus plantarum* expressando o fragmento C da toxina tetânica (Grangette e cols., 2001).

O operon da lactose (*lacTEGF*) do *Lactobacillus casei* ATCC393 [pLZ15]

Os genes envolvidos no metabolismo da lactose de *L. casei* estão agrupados em um único operon, o *lacTEGF*, que codifica um antiterminador (*lacT*) de elementos do sistema de fosfotransferase (PTS) específico de lactose (*Lac E* e *Lac F*) e uma fosfo- β -galactosidase (*lac G*) (Gonsalves e cols., 2001). O promotor contém um elemento responsivo a catabólitos (*cre*), seguido de uma sequência antiterminadora ribonucleica (RAT) e um terminador. A expressão dos genes do operon *lac* neste microorganismo está portanto submetida a uma regulação dupla: repressão por catabólitos (CR) e indução por lactose através da atividade de *LacT*, que impede a formação da estrutura de terminação no mRNA, possibilitando a transcrição completa dos genes do operon (antiterminação da transcrição).

A repressão por catabólitos (CR) é mediada pela proteína controladora de catabólitos (CcpA), que se liga ao elemento *cre* do promotor *lac* e é ativa na

presença de glicose. Além disso, a atividade de LacT também é controlada negativamente por glicose (Gonsalbes e cols., 1999).

A proteína LacT apresenta um domínio de ligação a RNA e dois domínios regulados pelo sistema PTS (PRD-I e PRD-II). De acordo com o modelo proposto para o controle, Lac T existiria em três formas: **1.** ativa (operon *lac* induzido, na presença de lactose) com o domínio PRD-I desfosforilado e PRD-II fosforilado; **2.** inativa (operon *lac* não induzido) quando ambos os domínios estão fosforilados e **3.** inativa, com o domínio PRD-II desfosforilado, forma observada na presença de glicose e considerada como um mecanismo CR secundário (Gonsalbes e cols., 2001).

O operon *lac* é portanto um sistema altamente induzido por lactose e totalmente reprimido quando a glicose é utilizada como fonte de carbono.

II. OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo a clonagem do domínio da proteína FHA de *Bordetella pertussis* que se liga a Heparina (domínio Hep) e subsequente expressão deste domínio em sistemas heterólogos para ser explorado como um potencial antígeno vacinal.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

1. Vetores de clonagem e expressão

.pGEM-T - Promega

.pAE-Sm14 (Fig. 01)

.pIA₅lacGFP - para expressão intracelular em lactobacilos (Fig. 03 A)

.pIA₅lac1133PVA - para expressão extracelular em lactobacilos (Fig. 03 B)

2. Preparação de DNA genômico de *Bordetella pertussis*

O DNA genômico da *Bordetella pertussis* (gDNA) foi purificado segundo os métodos convencionais (Sambrook e cols., 1989 e Ausubel e cols., 1989). Em resumo, a cultura de *Bordetella pertussis* foi centrifugada e o "pellet" bacteriano foi ressuspensão em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0; sacarose 0,25 %; lisozima 2 mg.ml⁻¹), incubado por 25 minutos a 37°C, seguido da adição de EDTA 80 mM e incubado por mais 25 minutos na mesma temperatura anterior. A seguir, as células foram lisadas com a adição de sarcosil 2% em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 por 10 minutos a 37°C. As proteínas foram digeridas com proteinase K (200 µg.ml⁻¹) a 50°C por 12 horas. Em seguida, o DNA foi precipitado com a adição de 2 volumes de etanol e 1/10 de volume de acetato de sódio 0,3 M. Após a centrifugação, o DNA foi lavado com etanol 70 %, ressuspensão em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 0,1mM) e tratado com RNase (50 µg.ml⁻¹, a 37°C por 10 minutos). A seguir, o DNA foi extraído com fenol / clorofórmio e o DNA foi precipitado novamente pela adição de 2 volumes de etanol e 1/10 de volume de acetato de sódio 0,3 M. Após centrifugação, o precipitado obtido foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspensão em TE. A concentração do DNA foi estimada por A₂₆₀.

3. Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Os ciclos utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse foram os seguintes:

-Ciclo I (realizado uma vez)

94°C por 4 minutos - desnaturação

62°C por 1 minuto - anelamento do primer

72°C por 1,5 minutos - extensão

A) pIA₅lacGFP - expressão intracelular

B) pIA₅lac1133PVA - expressão extracelular

Figura 03 – Mapa de restrição dos vetores de expressão em lactobacilos - A) Vetor pIA₅lacGFP para expressão intracelular e **B)** Vetor pIA₅lac1133PVA para expressão extracelular, o vetor contém o peptídeo sinal e a sequência "pré" da peptidase de parede de *Lactobacillus casei* (Holck & Naes, 1992), sendo assim um sistema para secreção de proteínas heterólogas.

-Ciclo II (realizado 30 vezes)
 94°C por 1 minuto - desnaturação
 62°C por 1 minuto - anelamento do primer
 72°C por 1,5 minutos - extensão
 -Ciclo III
 72°C - durante 7 minutos
 -Ciclo IV
 4°C - manter a esta temperatura

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições:

gDNA de <i>Bordetella pertussis</i> 1 µg / µl	1 µl
Tampão 10 X	10 µl
dNTP 10 mM	8 µl
Oligonucleotídeo "forward" 10 pmol	2 µl
Oligonucleotídeo "reverse" 10 pmol	2 µl
MgCl ₂ 50 mM	3 µl
DMSO (dimetil sulfoxido) 100 %	10 µl
Taq DNA polimerase platinum	1 µl
H ₂ O	63 µl
Total	100 µl

OBS: O DMSO foi utilizado, pois este facilita a desnaturação da dupla fita de DNA, como já foi descrito para amplificação de outros genes ricos em GC (Sun e cols., 1993).

Oligos para clonagem em *E. coli*

Região Mal80

Mal80 ("forward")

5' (1147) 3'
 TA CTC GAG GAA TTC AAG CAC ATC ACG CTG GTG TC
           XhoI   *EcoRI*

Fha2 ("reverse")

5' (2871) 3'
 CC CAA GCT T GC GGC CGC TCA ATT GGC GTG CAG CGA GTT
           HindIII   *NotI*

Hep (*"forward"*)

5' (1540) 3'

TA CTC GAG GAA TTC TTG AAG GCG GAC AAG CTG T

XhoI *EcoRI*

Fha2 (“reverse”)

5' (2871) 3'

CC CAA GCT T GC GGC CGC TCA ATT GGC GTG CAG CGA GTT

HindIII *NotI*

4. Rápida preparação de DNA para seleção de clones recombinantes

O método utilizado foi o descrito por Beuken e colaboradores (1998). Este método permite identificarmos os plasmídeos recombinantes por tamanho, e utiliza apenas um passo para a extração do DNA.

As colônias obtidas da transformação foram inoculadas com o auxílio de um palito estéril em um tubo estéril contendo meio LB acrescido de ampicilina (100 µg/ml) e deixados sobre agitação durante a noite a 37°C. Convém ressaltar que juntamente com as colônias, foi inoculado um vetor sem o fragmento de interesse para servir de controle.

A seguir, foram retirados 400 µl de cada cultura e as amostras foram centrifugadas por 30 segundos a 12000 rpm em microcentrífuga a TA (temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e o "pellet" foi ressuspensão em 100 µl de tampão de amostra (0,1 % bromofenol e 6 % sucrose). Após este passo, foi adicionado 40 µl de solução fenol:clorofórmio (1:1). A amostra foi vigorosamente agitada por 30 segundos e então centrifugada por 3 minutos a 12000 rpm em microcentrífuga. Cerca de 20 µl da fase aquosa foi analisada em gel de agarose 1 %.

5. Isolamento de DNA de plasmídeo em pequena escala

O método usado foi o da lise alcalina segundo Birnboim & Doly (1979), do Kit "Concert Rapid Plasmid Purification System" da GIBCO. Com o auxílio de um palito estéril uma colônia isolada foi retirada da placa obtida do experimento de transformação e colocada em um tubo estéril com 3 ml de LB contendo ampicilina (100 µg/ml).

Após 12-18 horas de crescimento a 37°C, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 12000 xg a TA. Ao precipitado foram adicionados 210 µl da solução de suspensão (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA e 20 µg/ml RNase A) e ressuspenso. A seguir,

foram adicionados 210 µl de uma solução de lise (200 mM NaOH; 1% SDS), e a amostra foi misturada por inversão do tubo e incubada por 5 minutos a TA. Após este período, foram adicionados 280 µl de uma solução de neutralização (acetato e hidrocloreto de guanidina), misturado por inversão e centrifugado por 10 minutos a 12000 xg a TA. O sobrenadante foi transferido para uma coluna previamente colocada em um tubo de lavagem, e centrifugado por 1 minuto a 12000 xg a TA. À coluna foi adicionado 700 µl de tampão de lavagem (NaCl, EDTA, Tris-HCl pH 8,0) e esse foi centrifugado por 1 minuto a 12000 xg a TA. Esta operação foi repetida para retirar ao máximo o tampão de lavagem da coluna. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo novo, e a ela foi acrescentado 75 µl de TE, pré-aquecido a 65°C, e incubado por 1 minuto a TA. Após este período, foi realizada uma centrifugação por 2 minutos a 12000 xg a TA e o DNA está pronto para uso. O DNA foi armazenado a -20 °C.

6. Digestão

Para a obtenção do material para a clonagem, foi realizada a digestão de 10 µg de DNA usando o tampão específico da enzima de interesse e 10 unidades da(s) enzima(s) de interesse em um volume final de 10 a 50 µl. A reação foi incubada à 37°C por 1 a 3 horas e depois analisada em gel de agarose.

7. Eletroforese em gel de agarose

À amostra de DNA digerido com diferentes enzimas foi adicionado 0,1 X o volume de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%). A seguir, as amostras foram aquecidas por 5 minutos a 65°C e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). O gel foi submetido a uma voltagem constante de 100 V até o azul de bromofenol atingir a borda inferior do gel.

8. Purificação de fragmento de DNA em gel de agarose

Os produtos das digestões foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE, em sistema preparativo. Após a corrida, a banda correspondente ao inserto ou vetor de interesse foi visualizada com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), cortada do gel e colocada em um tubo. Ao tubo foi acrescentado o tampão de solubilização (kit "Concert Gel Extraction Systems" da GIBCO-BRL), sendo que foi utilizado 60 µl do tampão para cada 10 mg de gel de agarose. A solução foi incubada por 15 minutos a

50°C, sendo que esta foi misturada a cada 3 minutos por inversão do tubo. Após completa solubilização, a solução foi incubada por mais 5 minutos. A solução foi transferida para uma coluna previamente colocada num tubo de lavagem e centrifugada por 1 minuto a 12000 xg a TA. À coluna foi acrescentado 700 µl de tampão de lavagem e incubado por 5 minutos a TA. Após este período, a solução foi centrifugada por 1 minuto a 12000 xg a TA e a coluna transferida para um tubo novo. A seguir, foi adicionado 50 µl de TE pré-aquecido a 65°C, incubado por 1 minuto a TA e centrifugada por 2 minutos a 12000 xg a TA. O DNA foi recolhido e mantido a -20 °C.

9. Ligação

Os vetores de interesse foram digeridos com as enzimas de restrição adequadas e purificados nas mesmas condições descritas no item 8. Os vetores foram ligados ao inserto em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,8 contendo MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1mM e adicionado 1 U de T4 DNA ligase em um volume final de 20 µl. A reação de ligação foi feita a 16°C durante a noite. Foram também realizadas ligações contendo apenas o vetor para controle.

10. Obtenção de células competentes

Uma colônia isolada da cepa de interesse de *E. coli* mantida em placas de meio mínimo M9 (Cloreto de amônia 1 g/L, fosfato de sódio 6 g/L, fosfato de potássio 3 g/L e cloreto de sódio 0.5 g/L num pH final = 7,4), foi inoculada em meio líquido LB (20 ml) e incubada a 37°C sob agitação até atingirem uma densidade óptica de 0,5 a 600 nm. A cultura foi então mantida por 15 minutos no gelo e, a seguir, as células foram centrifugadas a 1000 xg por 5 minutos a 4°C, sendo que o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 10 ml de CaCl₂ 100 mM (1/2 do volume inicial) e incubadas no gelo por mais 20 minutos. Procedeu-se então nova centrifugação a 1000 xg por 5 minutos e o precipitado foi ressuspensão em 2 ml de CaCl₂ 100 mM (1/10 do volume inicial). Após 20 minutos no gelo, as células estão prontas para uso.

Obs: Quando a cepa utilizada foi a BL21SI, ela sempre foi mantida em meio sem sal.

11. Experimento de transformação

Para o experimento de transformação foram adicionados 50 µl de células competentes a 10 µl do volume da ligação e a mistura foi incubada no gelo por uma hora. As células foram então submetidas a choque térmico (37°C por 5 minutos ou 42°C por 2 minutos) e colocadas novamente no gelo por 5 minutos. A seguir, as células foram recuperadas por uma hora a 37°C após adição de 0,8 ml de LB líquido. As células foram centrifugadas por um minuto à temperatura ambiente, ressuspensas em 0,2 ml de LB líquido e plaqueadas em LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/ml). As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas.

As colônias obtidas foram repicadas em placas de meio LB contendo ampicilina e analisadas através de mini preparações de plasmídeo.

Obs: Quando a cepa utilizada foi a BL21SI, ela sempre foi mantida em meio sem sal.

12. Experimento de indução protéica e análise em gel de SDS-PAGE

O clone que contém o inserto de interesse foi transformado utilizando a cepa de BL21SI (Life Technologies) de *E. coli*. Uma colônia isolada foi incubada em 5 ml de LBON (meio LB sem NaCl) contendo ampicilina (100 µg/ml) e deixada sob agitação até D.O.₆₀₀ = 0,6. A seguir, foi retirado 1 ml desta amostra para controle (não induzido) e foi adicionado ao restante NaCl para uma concentração final de 0,3 M. As células foram mantidas sob agitação por mais 2 horas, quando foi retirado mais 1 ml para averiguar em gel de poliacrilamida contendo SDS se houve a indução.

As amostras retiradas foram centrifugadas por 5 minutos a 12000 xg e ressuspensas em tampão de amostra 1 X (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS, 10% Glicerol e 0,1% de azul de bromofenol) e fervidas por 10 minutos antes da aplicação no gel.

Para fazer a indução em grande escala, as colônias foram inoculadas em 1 L de LB contendo ampicilina, sendo que as condições de indução foram as mesmas descritas acima. Após a indução, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 10000 rpm no rotor GSA SLA-1500 a 4°C.

13. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Esta eletroforese foi feita segundo o método de Laemmli (1970). O gel de corrida foi de 7% a 12% de acrilamida e o de empilhamento 4,5%, e a espessura do gel cerca de 1 mm. A amperagem utilizada para a corrida foi de 20 mA durante o gel de empilhamento

e de 25 mA para o gel de separação. Após a eletroforese o gel foi corado com "coomassie blue" 0,25% (metanol 50%; ácido acético glacial 10% e coomassie blue 0,25%) durante uma hora e depois descorado com uma solução de metanol 30% e ácido acético glacial 10% até a visualização das bandas.

14. Purificação da proteína recombinante em coluna de níquel (NiSO₄)

O "pellet" celular correspondente a proteína recombinante induzida em escala de 1L foi ressuspenso em 30 ml de tampão de extração (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl e 10 mM Imidazol) contendo 0,1% de Triton X-100. Após a homogeneização, a amostra foi submetida a "French-press" a uma pressão de 1500 psi até ficar translúcida. A seguir a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 10000 rpm no rotor GSA SLA-1500 a 4°C e separada em "pellet" e sobrenadante.

14.1. Sobrenadante da lise das bactérias

Após a centrifugação, o sobrenadante foi guardado em gelo até ser aplicado na coluna de Níquel-Sepharose.

A resina utilizada foi a "Chelating Sepharose Fast Flow" (Pharmacia), sendo utilizado um total de 5 ml. Primeiramente, a resina foi lavada com água (5 vezes o volume da coluna), e ativada com solução de NiSO₄ 300 mM (5 vezes o volume da coluna), seguida de água (5 vezes o volume da coluna). A seguir, a resina foi equilibrada com o tampão de extração descrito no item 14.

A amostra foi aplicada na coluna (diâmetro de 1 cm) num fluxo contínuo de 1 ml/min, e a seguir, foi realizada a lavagem da coluna com o tampão contendo 60 mM Imidazol, 300 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl pH 6,8 (10 vezes o volume da coluna). A amostra foi eluída com o tampão de eluição contendo 500 mM Imidazol, 100 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl pH 6,8 em frações de 1 ml. A cromatografia foi monitorada pela eletroforese em SDS- PAGE das frações obtidas.

Após a eluição da amostra, a coluna foi lavada para a retirada do Níquel com 10 ml da solução NaCl 600 mM, Tris-HCl pH 8,0 100 mM e EDTA 100 mM, seguida de 15 ml de NaOH 500 mM e 15 ml de água. A coluna foi mantida em solução de etanol 20 %.

14.2. Precipitado da lise das bactérias

O precipitado obtido após a centrifugação foi lavado com 25 ml de tampão de lavagem (2 M Uréia, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM β-mercaptoetanol) e centrifugado

por 15 minutos a 10000 rpm no rotor GSA SLA-1500 a 4°C. A seguir, foi efetuada outra lavagem e os corpúsculos de inclusão foram solubilizados em 20 ml de solução contendo 8 M Uréia, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM de NaCl e 10 mM β -mercaptoetanol. A amostra foi mantida sob agitação por 4 horas a TA e a seguir foi misturada gota a gota em 1 litro de solução contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM de NaCl e 5 mM Imidazol, sempre sob agitação durante 15-20 horas. Após este período a amostra foi aplicada na coluna contendo a resina "Chelating Sepharose Fast Flow" (Pharmacia) preparada conforme descrito acima. No entanto, ao invés da coluna ter sido equilibrada com o tampão de extração, esta foi equilibrada com 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM de NaCl e 5 mM Imidazol. A amostra foi aplicada na coluna num fluxo de 1 ml/min, e após lavagem com tampão de lavagem contendo 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl pH 6,8 (10 vezes o volume da coluna), a amostra foi eluída com o tampão de eluição contendo 500 mM Imidazol, 100 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl pH 6,8 em frações de 1 ml. A cromatografia foi monitorada pela eletroforese em SDS- PAGE das frações obtidas.

Após a eluição da amostra, a coluna foi lavada conforme descrito no item acima.

15. Purificação da proteína recombinante em coluna de Heparina-Sepharose

A resina (5 ml) utilizada foi a "Heparina-Sepharose" CL-6B (Pharmacia). A coluna (1 cm de diâmetro) foi lavada com água (10 vezes o volume da coluna) e equilibrada com tampão salina fosfato (PBS). A amostra proveniente da coluna Ni^{+2} -Sepharose foi diluída 10 vezes em água e após sua aplicação na coluna em um fluxo de 1ml/min e extensiva lavagem da coluna com PBS, a proteína recombinante foi eluída utilizando PBS contendo 0,5 M de NaCl em frações de 1 ml. A cromatografia foi monitorada pela eletroforese em SDS- PAGE das frações obtidas e pela leitura da densidade óptica das frações.

Após eluição da amostra a coluna foi lavada com NaCl 2,5 M (10 vezes o volume da coluna), seguida de água (10 vezes o volume da coluna) e mantida em solução de mertiolate 0,02 %.

16. Obtenção dos antisoros

A proteína purificada foi diluída em adjuvante de Freund completo (1:1, v:v) e injetada via intraperitoneal em camundongos Balb-C (20 μg /animal). Após 15 dias, foi aplicada a segunda injeção contendo a mesma quantidade de proteína, diluída em adjuvante de Freund incompleto (1:1). Dez dias após a segunda injeção, foi aplicada uma terceira injeção contendo a mesma quantidade de proteína diluída em adjuvante de

Freund incompleto (1:1). Após uma semana, os animais foram sangrados e os soros obtidos após centrifugação a 4000 xg por 5 minutos, foram armazenados a -20°C.

Alternativamente, o DNA foi injetado em camundongos Swiss fêmea de 14 a 16 g (50 µg/animal) pela via intramuscular (im), sendo 25 µg por músculo tibial anterior num intervalo de 2 semanas entre as imunizações. Convém ressaltar que os camundongos foram inoculados com cardiotoxina (Latoxan) via intramuscular (10 µg por animal) cinco dias antes da primeira injeção de DNA e/ou Proteína por ser um potente ativador da resposta imune quando se utiliza DNA como antígeno (Davis e cols., 1993).

17. ELISA

A análise da especificidade e título do anticorpo contra as proteínas recombinantes foi realizada por ELISA. A placa de ELISA foi sensibilizada com as proteínas de interesse em diversas concentrações em tampão carbonato (Na_2CO_3 0,05 M, pH 9,6) (100 µl/poço) por aproximadamente 14 horas a 4°C. Após a lavagem dos poços com PBS/Tween 0,05% (PBS-T), os mesmos foram bloqueados com 200 µl/poço de uma solução de tampão carbonato contendo 3 % de BSA por 2 horas em estufa a 37°C. A seguir, foram lavados com PBS-T e incubados com 100 µl/poço de diluições seriadas do anticorpo em tampão PBS contendo 1 % de BSA e 0,05 % de Tween 20 por 1 hora em estufa a 37°C. Após a lavagem dos poços, uma nova incubação foi realizada com 100 µl/poço do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição 1:2000, diluído em tampão PBS contendo 1 % de BSA e 0,05 % de Tween 20 e incubado por 1 hora em estufa a 37°C. A seguir, foi realizada nova lavagem com PBS-T, e foi adicionado aos poços 100 µl/poço da solução o-phenilediamina dihidroclorato (OPD) 0,4 mg/ml em tampão fosfato-citrato 0,05M, pH 5.0. A reação foi interrompida com 50 µl/poço da solução H_2SO_4 30 % e a absorbância foi lida a 492 nm em leitor de microplacas (Labsystems).

18. Western-blot

O procedimento usado é basicamente o descrito por Towbin e colaboradores (1979). Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10%, os polipeptídeos contidos no gel foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose utilizando um aparato tipo sanduíche (Biorad) submerso em tampão de transferência (Tris-base 25 mM, glicina 126mM e metanol 20%) e submetido a uma voltagem de 80 V por 2 horas. Após a transferência, o filtro foi corado com Ponceau S 0,1 % contendo ácido acético 10% e

descolorados com água destilada a fim de podermos visualizar a eficiência da transferência. Os padrões de massa molecular foram identificados e marcados com uma caneta a prova d'água na membrana de nitrocelulose.

A seguir, o filtro foi colocado em uma solução de bloqueio PBS/leite (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 150 mM e leite desnatado 5%) por 30 minutos. Após este período, o filtro foi incubado com o antisoro de interesse sob agitação a 4°C durante a noite. No dia seguinte, o filtro foi lavado 4 vezes por 10 minutos com uma solução de PBS-T e uma vez por 10 minutos com PBS. A seguir, o filtro foi incubado com o soro anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase por uma hora, e lavado como descrito acima. Após as lavagens, as bandas foram reveladas pela adição de 12 mg de 4-cloro 1-naphtol em 4 ml de metanol e 20 ml de PBS mais 12 µl de H₂O₂ 30 % (Harlow e Lane, 1988). A reação foi interrompida pela lavagem da membrana em água destilada. Em alguns experimentos, as bandas foram reveladas com uma mistura de BCIP/NBT (BCIP = 5-bromo-4-chloro -3-indoxyl phosphate, disodium salt e NBT = Nitro blue tetrazolium, chloride). Neste caso foi utilizado anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina.

19. TAP EXPRESS (Kit comercial da empresa Gene Therapy System)

19.1.1. Desenho do oligonucleotídeo 5' (“forward”)

O oligonucleotídeo 5' deve conter entre 41 a 46 nucleotídeos, sendo que destes, 26 correspondem ao "5' TAP Ends universal sequence" e os outros 15-20 nucleotídeos correspondem a sequência específica do gene a ser amplificado. É importante ressaltar que o códon de transcrição ATG deve ser sempre incluído no oligonucleotídeo, como podemos verificar a seguir:

19.1.2. Desenho do oligonucleotídeo 3' (“reverse”)

O oligonucleotídeo 3' deve conter no mínimo 40 nucleotídeos, sendo que destes, 20 correspondem ao "3' TAP Ends universal sequence" e os outros 20 nucleotídeos devem corresponder a seqüência específica do gene a ser amplificado. É importante ressaltar que o códon de terminação TCA (ou TTA ou CTA) deve ser sempre incluído no oligonucleotídeo, como podemos verificar a seguir:

5' CATCAATGTATCTTATCATGTCTGA **TCA** NNN NNN NNN NNN NNN... 3'

"3' universal sequence"

sequência do gene de interesse

Primers Utilizados:

Região Hep

"Forward": TAPHEPF

5' CTGCAGGCACCGTCGTCGACTTAACA **ATG** AAG GCG GAC AAG CTG TC 3'

"Reverse": TAPHEPREV

5' CATCAATGTATCTTATCATGTCTGA **TCA** ATT GGC GTG CAG CGA GT 3'

Região S1

"Forward": TAPS1F

5' CTGCAGGCACCGTCGTCGACTTAACA **ATG** GAC GAT CCT CCC GCC AC 3'

"Reverse": TAPS1REV

5' CATCAATGTATCTTATCATGTCTGA **CTA** GAA CGA ATA CGC GAT GC ... 3'

19.2. Primeiro PCR

Nesta etapa, o gene de interesse foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos sintetizados produzindo um fragmento híbrido ("TAP primary fragment") contendo as seqüências 5' e 3' necessárias para a ligação, em um segundo PCR, com as regiões promotoras e terminadoras.

Os ciclos utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse, assim como as reações utilizadas, foram os mesmos do item III.3.

19.3. Segundo PCR

Nesta etapa o fragmento híbrido contendo o gene de interesse é ligado às regiões promotora (CMV) e terminadora (SV40) através de uma segunda reação de PCR. Para isso, o fragmento híbrido obtido na primeira reação de PCR é adicionado a outros dois fragmentos contidos no kit (região promotora CMV e região terminadora SV40) e a reação de PCR é realizada com dois oligonucleotídeos referentes as extremidades 5' da região promotora e 3' da região terminadora.

Os ciclos utilizados para a amplificação dos fragmentos foram os seguintes:

-Ciclo I (realizado uma vez)

94°C por 1 minuto - desnaturação

-Ciclo II (realizado 30 vezes)

94°C por 30 segundos - desnaturação

60°C por 30 segundos - anelamento do primer

72°C por 3 minutos - extensão

-Ciclo III

72°C - durante 10 minutos

-Ciclo IV

4°C - manter a esta temperatura

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições:

DNA proveniente do Primeiro PCR	1 µl
Tampão 10 X	5 µl
dNTP 10 mM	1 µl
Oligonucleotídeo "Promoter Mix" 10 pmol	2 µl
Oligonucleotídeo "Terminator Mix" 10 pmol	2 µl
MgCl ₂ 50 mM	5 µl
Taq DNA polimerase platinum	1 µl
H ₂ O	33 µl
Total	50 µl

"Promoter Mix" = contém o fragmento promotor do TAP express e o primer correspondente ao promotor TAP.

"Terminator Mix" = contém o fragmento terminador do TAP express e o primer correspondente ao terminador TAP.

OBS: O produto da reação foi analisado através de gel de agarose utilizando 5 µl da amostra. Convém ressaltar que a adição do "Promoter Mix" e do "Terminator Mix" aumenta o tamanho do gene de interesse em 1 kb.

20. Transfecção de DNA

As células BHK-21 (*baby hamster kidney*) foram crescidas em meio DMEM contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) até ficarem semiconfluentes, lavadas e transfectadas conforme descrito a seguir. O DNA foi diluído em meio DMEM contendo lipofectamina e deixado a TA por 15 minutos. A seguir, este foi misturado às células BHK-

21 e incubado em CO₂ por 4 horas a 37°C. Após este período, o meio das células foi trocado, adicionando meio completo (DMEM com 10 % SFB) e este foi mantido durante a noite. As células foram lavadas 2 vezes com PBS 1 X e extraídas com o tampão de lise RIPA da Clontech (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 % Triton X100, 1 % desoxicolato de sódio, 0,1 % SDS, 1 % aprotinina e 0,1 mM Na₃VO₄) 24 horas após a transfecção. Após a adição de 1 ml do tampão de lise RIPA, o lisado foi transferido para um tubo falcon e mantido no gelo por 20 minutos. O lisado foi centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo e armazenado a - 70°C até ser utilizado. A dosagem foi realizada pelo método de Bradford e a expressão foi analisada por western-blot (foram utilizadas 30 µg para análise).

21. Experimento de Desafio com *Bordetella pertussis*

21.1. Cronograma do Experimento de Desafio:

DIA 01: Chegada dos camundongos ao biotério

DIA 02: Sangria Pré-Imune

DIA 03: Injeção de Cardiotoxina

DIA 08: Injeção de DNA e/ou Proteína

DIA 22: Primeira Sangria

DIA 23: Injeção de DNA e/ou Proteína

DIA 29: Segunda Sangria

DIA 30: DESAFIO

DIA 31 AO 44: Contagem da taxa de mortalidade dos camundongos

21.2. Imunização

21.2.1. Injeção de Cardiotoxina

Convém ressaltar que os camundongos foram inoculados com cardiotoxina (Latoxan) via intramuscular (10 µg por animal) cinco dias antes da primeira injeção de DNA e/ou Proteína por ser um potente ativador da resposta imune quando se utiliza DNA como antígeno (Davis e cols., 1993).

21.2.2. Injeção de DNA e/ou Proteína

Os camundongos foram imunizados com 50 µg de DNA via intramuscular (im), sendo 25 µg por músculo tibial anterior e/ou 20 µg de Proteína via intraperitoneal (ip).

21.3. Desafio com *Bordetella pertussis*

Os camundongos imunizados foram desafiados via intracerebralmente com *Bordetella pertussis*. Para tanto, 30 µl de uma suspensão bacteriana contendo *B. pertussis* da cepa 18323 (18,500 CFU) foi inoculada nos camundongos e a sobrevivência dos animais foi monitorada por 15 dias, descartando a morte ocorrida nos três primeiros dias, pois neste dias a morte é atribuída a manipulação dos camundongos.

22. Purificação de FHA

22.1. Cromatografia de Afinidade em “Cellufine Sulfate” (Amicon)

O extrato total de *Bordetella pertussis* foi centrifugado a 6500 rpm por 30 minutos a 4°C no rotor GSA SLA-1500. A seguir, o sobrenadante foi separado para a sua aplicação na coluna previamente equilibrada. Ao sobrenadante foi adicionado PMSF para concentração final de 0,5 mM.

A resina (300 ml) foi lavada com água e equilibrada com 0,01 M de tampão fosfato de sódio pH 7,6 (Na₂HPO₄) contendo EDTA 5 mM (10 vezes o volume da coluna). O sobrenadante foi aplicado na coluna (XK50 Pharmacia) num fluxo de 4 ml/min e após extensiva lavagem da coluna com o mesmo tampão, a proteína foi eluída utilizando o tampão 0,01 M de tampão fosfato de sódio contendo 1 M de NaCl e EDTA 5 mM em frações de 10 ml. A cromatografia foi monitorada pela leitura da densidade óptica a 595 nm das frações pelo método de Bradford (1976).

Após eluição da amostra a coluna foi lavada com 0,01 M de tampão Na₂HPO₄ pH 7,6 (10 vezes o volume da coluna), seguida de NaOH 0,1 M (10 vezes o volume da coluna) e mantida em solução de 3 M de NaCl contendo azida sódica 0,02 %.

22.2.1. Cromatografia de afinidade – Coluna Fetuína-Sepharose

A coluna foi lavada com água (10 vezes o volume da coluna) e equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. A amostra proveniente da coluna “Cellufine Sulfate” foi diluída 100 vezes no mesmo tampão descrito acima. Após sua aplicação na coluna em um fluxo de 4 ml/min e extensiva lavagem da coluna, foram realizadas várias eluições (com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,4; tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 contendo NaCl 1 M e com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 contendo MgCl₂ 4 M). A cromatografia foi monitorada pela leitura da densidade óptica das frações obtidas e por eletroforese em SDS- PAGE.

22.2.2. Gel Filtração

Alternativamente, as amostras provenientes da coluna “Cellufine Sulfate” foram submetidas a cromatografia de filtração em gel utilizando uma coluna (Superdex 200 HR 10/30) conectada a um aparelho de Cromatografia AKTA 10 (Laboratório do Prof. Paulo E. M. Ribolla – Parasitologia – UNESP - Botucatu). O fluxo (0,5 ml/min) e a concentração do tampão eluente (PBS) foram mantidos constantes durante toda a corrida e as frações (1 ml) foram obtidas por um coletor de frações conectado ao sistema. Após a eluição da amostra, a coluna foi lavada com PBS (10 vezes o volume da coluna), seguida de água (10 vezes o volume da coluna) e mantida em solução de etanol 20 %.

22.3. ELISA “sandwich”

A placa de ELISA foi sensibilizada com os soros policlonais em tampão carbonato (Na_2CO_3 0,05 M, pH 9,6) (100 μl /poço) por aproximadamente 14 horas a 4°C (soro policlonal de cabra anti-PT 1:4000 e soro policlonal de coelho anti-FHA 1:3000) . Após a lavagem dos poços com PBS/Tween 0,05 %, os mesmos foram incubados com diluições seriadas das proteínas de interesse (100 μl /poço) a serem analisadas e as amostras foram mantidas por 2 horas em estufa a 37°C. Também é realizado a curva padrão de PT e FHA, sendo que a concentração inicial de PT e de FHA é de 1 μg . Após lavagem com PBS/Tween 0,05 % os poços foram bloqueados com 200 μl /poço de uma solução de tampão carbonato contendo 10 % de leite Molico e mantido por 30 min em estufa a 37°C. A seguir, foram lavados com PBS/Tween 0,05 % e incubados com 100 μl /poço da diluição do anticorpo em tampão PBS contendo 1 % de BSA (soro policlonal de camundongo anti-PT 1:3000 e soro policlonal de camundongo anti-FHA 1:3000) por 1 hora em estufa a 37°C.

Após a lavagem dos poços, uma nova incubação foi realizada com 100 μl /poço do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição 1:2000, diluído em tampão PBS contendo 1 % de BSA e 0,05 % de Tween 20 e incubado por 1 hora em estufa a 37°C. A seguir, foi realizada uma nova lavagem com PBS/Tween, e foi adicionado aos poços 100 μl /poço da solução o-phenilediamina dihidroclorato (OPD) 0,4 mg/ml em tampão fosfato-citrato 0,05M, pH 5.0. A reação foi interrompida com 50 μl /poço da solução H_2SO_4 30 % e a absorbância foi lida a 492 nm em leitor de microplacas (Labsystems). A concentração das amostras foi calculada utilizando o método de linhas paralelas.

23. Ensaio de hemaglutinação

O ensaio foi realizado com eritrócitos de ganso recém preparados. O sangue recolhido do ganso (5 ml) foi misturado 1:1 com a solução de Alsever (glicose 2,05 g, citrato de sódio 0,8 g e cloreto de sódio 0,42 g para 100 ml pH 6,1). Esta solução pode ser mantida por 15 dias na geladeira. A seguir, as hemácias foram lavadas 3 vezes com PBS 1 X e estão prontas para o uso.

A seguir, as hemácias foram misturadas com a proteína de interesse diluídas em PBS (50 µl) numa placa em tubo U e deixados a TA por 2 horas. Após este período, foi analisado se houve ou não a hemaglutinação. Em alguns experimentos, para verificarmos a inibição da hemaglutinação pelos antisoros, as proteínas foram previamente incubadas com os antisoros por 2 horas a 37°C antes de serem incubadas com as hemácias.

24. Lactobacilos

24.1. Amplificação da Região de Interesse

Primers Utilizados:

Região Hep

“Forward”: LACHEPF

5' TACTCGAGAGATCT **ATG** AAG GCG GAC AAG CTG TC 3'

BglII

“Reverse”: LACHEPREV

5' ACGAATTC **TCA** ATT GGC GTG CAG CGA GT 3'

EcoRI

Os ciclos e as reações utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse foram os mesmos do item III.3.

24.2. PCR de colônias

Para a análise da clonagem da região Hep no vetor de lactobacilos, foi realizado PCR de colônias de *E. coli* DH5α obtidos após a transformação com as misturas de ligação, utilizando os oligonucleotídeos abaixo ou complementares ao fragmento de interesse.

lac 11: 5' TAGCACTGATCATTAAA 3' (complementar ao início do promotor *lac*)

puc forw: 5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3'

Os ciclos e as reações foram semelhantes aos utilizados no item III.3.

24.3. Preparação de DNA plasmidial de lactobacilos

Cada clone foi crescido até a fase exponencial em meio MRS, a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos e lavadas 1 X com 10 ml de 50 mM EDTA. O pellet foi ressuspensão em 600 µl de tampão de lise (10 % PEG 20000, 10 mM TrisHCl pH 8,5 mM Na maleato e 5mM MgCl₂) contendo 5 mg lizosima/ml e as células foram incubadas a 37°C por 2h. A seguir, as células foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 600 µl de 2 mM Tris-HCl pH 8. A lise foi feita pela adição de 1 % SDS em 50 mM Tris-HCl pH 8 e 20 mM EDTA. O DNA de alto peso foi desnaturado pela adição de 1:10 de 1 N NaOH e incubado por 10 min a TA; posteriormente foi adicionado 10 µl de 2 M Tris-HCl, pH 7 e mantido em gelo por 10min. A seguir, as células foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi submetido à extração com fenol, com fenol:clorofórmio (1:1) e a seguir com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado pela adição de 0,6 volumes de isopropanol e foi coletado por centrifugação. O DNA foi ressuspensão em 30 µl de TE contendo 50 µg RNase/ml e incubado por 15 min a 37°C. Dez microlitros desta preparação foram utilizados para análise por eletroforese em gel de agarose.

24.4. Transformação de lactobacilos por eletroporação

24.4.1. Preparação da amostra

O DNA de lactobacilos foi preparado como descrito no item 22.2, só que este foi ressuspensão em água ao invés de TE.

24.4.2. Preparação de lactobacilos competentes

Com o auxílio de um palito estéril uma colônia isolada de *Lactobacillus casei* foi incubada em meio MRS e procedeu-se a incubação a 37°C por aproximadamente 18 horas. A seguir, a cultura foi diluída (1:25) em MRS contendo 0,5% a 1% de glicina e mantida sob agitação até atingir D.O.₅₅₀ entre 0,4 e 0,6.

A seguir, as células foram centrifugadas a 1500 xg por 10 minutos a 4°C e o precipitado obtido foi lavado 2 X com o tampão de eletroporação (0,3 M sacarose, 5 mM fosfato de sódio pH 7,4 e 1 mM MgCl₂) e ressuspensão em um volume equivalente a 1:100 do volume original da cultura. As células foram alicotadas em 50 µl e utilizadas de imediato para transformação por eletroporação. Todo processo foi feito em gelo.

24.4.3. Eletroporação

Os lactobacilos eletrocompetentes foram misturados ao DNA (1-10 µg). A eletroporação foi realizada em cubetas de 0,2 cm, nas seguintes condições; 1500 V, 200 Ohm e 25 F. Em seguida, foi adicionado 950 µl de meio MRS contendo 0,3 M sacarose; 20 mM MgCl₂ e 2 mM CaCl₂ e a cultura foi deixada sob agitação por 2 horas a 37°C. O volume total da transformação foi dividido em três placas de MRS contendo 5 µg eritromicina / ml. As placas foram incubadas a 37°C por 3 a 4 dias até o aparecimento de colônias resistentes.

24.5. Indução da expressão em *Lactobacillus casei*

Os clones obtidos após as transformações foram mantidos a – 80°C. Para a análise da expressão, cada clone foi inoculado em 2 ml de meio MRS caseiro (MRS C - para 1 L: 10 g peptona; 8 g extrato de carne; 4 g extrato de levedura; 1 ml Tween 80; 2 g fosfato de potássio; 5 g acetato de sódio, 2 g citrato diamônico; 0,2 g MgSO₄; 0,05 g MnSO₄), tamponado com 200mM fosfato de potássio pH 6,7; contendo glicose (condição não induzida) e lactose ou ribose (condição induzida) dependendo da linhagem utilizada. Após um período de crescimento, estas culturas foram passadas para um volume final de 10 ml dos respectivos meios e mantidas até atingirem a saturação. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 10 min, ressuspensas em 1 ml de 100 mM Tris-HCl pH 8, e passadas para um tubo contendo o mesmo volume de “bolinhas” de vidro (glass beads -106 microns - Sigma). A lise foi feita mecanicamente, por agitação em um aparelho “Fast Prep”. O lisado foi centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi passado para um tubo limpo. A análise da expressão foi realizada por Western-blot.

24.6. Imunização

Foram utilizados camundongos das linhagens Balb/c em grupos de 6 camundongos para cada condição dos experimentos.

As linhagens de interesse foram crescidas em meio de indução, como descrito no item anterior, até atingirem a DO₅₅₀= 2,0. As bactérias foram coletadas por centrifugação e foram ressuspensas em solução salina estéril de forma a obtermos 2 X 10⁹ CFU em 20µL. Este volume foi inoculado em 2 X de 10 µL cada, lentamente nas duas narinas dos camundongos com o auxílio de uma micropipeta. Nos experimentos descritos neste

relatório, foram realizados três inóculos por semana, em dias consecutivos, a cada três semanas, num total de 9 inóculos. O sangue e a saliva dos animais foram coletados um dia antes das imunizações para a análise da presença de IgG ou IgA específicas para cada antígeno. O sangue foi mantido a 37°C por 30 min e centrifugado a 2000 RPM por 10 min. O soro e a saliva coletados foram mantidos a -20°C. Em alguns casos foram realizadas imunizações pela via subcutânea. Neste caso, as amostras foram preparadas da mesma forma e foram inoculados 2×10^7 CFU em 100 µL em cada animal, uma dose por vez a cada duas semanas, num total de 3 inóculos.

IV – RESULTADOS

1. Domínio de ligação à Heparina da proteína FHA de *Bordetella pertussis*

O domínio Heparina foi deduzido por Hannah e colaboradores (1994) onde foi relatado a expressão de 4 regiões da porção N-terminal de FHA (Fig. 04 A) e analisadas as suas respectivas afinidades por heparina. Neste trabalho, eles observaram que a proteína correspondente a região Mal80 (aminoácidos 299-863) possui uma afinidade por heparina equivalente ao da FHA nativa. Tendo em vista que a região Mal2 (aminoácidos 16-441) possui baixa afinidade por heparina e que sobrepõe parte da região Mal80, os autores sugerem que o sítio de ligação a heparina está contido na região Mal80 onde não há sobreposição com a região Mal2, isto é, entre os aminoácidos 442 e 863. Esta região é objeto de estudo deste trabalho e foi denominada de região Hep.

2. Expressão de antígenos recombinantes em *Escherichia coli*

Foram amplificadas duas regiões do domínio de ligação à Heparina da FHA de *Bordetella pertussis* (Fig. 04 B) utilizando oligonucleotídeos sintetizados a partir da sequência de FHA (Delisse-Gathoye e cols., 1990). A sequência de DNA da região Mal80 (aminoácidos 299-873) e da região Hep (aminoácidos 430-873), relativas ao domínio Heparina de FHA de *B. pertussis* foram amplificadas pela técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos sintéticos derivados destas sequências usando como molde o DNA genômico de *Bordetella pertussis*. Os "primers" foram desenhados com sítios de restrição específicos nas extremidades 5' e 3' para a clonagem direcional no vetor correspondente (pAE para *E. coli*). Convém ressaltar que houve uma grande dificuldade na realização dos experimentos de PCR, onde várias condições foram realizadas sem sucesso. O PCR só foi positivo quando acrescentamos DMSO à reação. Isso porque o genoma de *Bordetella pertussis* é rico em CG, e o DMSO facilita a desnaturação da dupla fita de DNA, como já foi descrito para a amplificação de outros genes ricos em GC (Sun e cols, 1993). O conteúdo de CG na proteína de FHA é de 67 %, enquanto que na região Mal80 é de 72 % e na região Hep é de 71 %.

A)

B)

FIGURA 04 – Esquema dos domínios que compõe a proteína de FHA – A) Regiões de FHA expressas por Hannah e colaboradores (1994); **B)** regiões de FHA a serem amplificadas (Mal80 e Hep). B – *Bam*HI, E – *Eco*RI, S – *Sal*I e Sp – *Sph*I.

2.1. REGIÃO Mal80

2.1.1. Amplificação, clonagem, expressão e purificação da região MAL80 do domínio de ligação à Heparina da proteína FHA de *Bordetella pertussis*

A região Mal80 foi amplificada (Fig. 05 A) através do experimento de PCR utilizando os primers Mal80 e Fha2 nas condições descritas no item III.3. A seguir, o fragmento obtido foi ligado ao vetor pGEM-T e as colônias obtidas por transformação foram analisadas através da digestão com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* (Fig. 05 B).

Os clones # 1 e # 7 foram seqüenciados para verificarmos se a clonagem foi bem sucedida e se não houve mutação ou perda de aminoácidos. Os resultados foram positivos (resultado não mostrado). Os clones foram então digeridos com as enzimas *HindIII* e *XhoI*, e o fragmento purificado foi ligado ao vetor pAE previamente digerido com as mesmas enzimas. Após a transformação, foi realizado o experimento de rápida extração de DNA descrito por Beuken e colaboradores (1998). Através deste método é possível identificar os plasmídeos recombinantes por tamanho (Fig. 05 C). A seguir foi realizada a preparação de plasmídeo dos clones (#2, 7, 8, 9, 10 e 11) que apresentavam tamanho maior que o controle (vetor pAE). Foi então realizada a digestão dupla dos clones com as enzimas *HindIII* e *XhoI* para confirmar a presença do fragmento de interesse (Fig. 05 C). Todos os clones positivos (#2, 7, 8, 9, 10 e 11) foram seqüenciados e foi observado que a clonagem estava correta (resultados não mostrados).

O clone que continha o fragmento de interesse em fase com o vetor de expressão pAE (pAEMAL80 # 2) foi transformado na cepa BL21SI de *E. coli* e a expressão foi realizada conforme descrito no item III.12. Convém ressaltar que outras cepas (BL21 (DE3), BL21(DE3)Star, BL21(DE3)pLysS e BL21(DE3)CodonPlus-RP) foram utilizadas sem sucesso¹. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida contendo SDS e foi observada a indução de uma proteína recombinante de aproximadamente 57 kDa (Fig. 06). A seguir, a colônia que apresentava a indução foi inoculada novamente em meio LBON contendo ampicilina (1 L) para obtermos uma quantidade maior de proteína induzida (resultado não mostrado). As condições de indução foram as mesmas descritas acima. O "pellet" obtido da indução foi ressuspensão em tampão 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl e 10 mM Imidazol contendo 0,1% de Triton X-100 e a suspensão foi submetida a "French Press" a uma pressão de 1500 psi até a solução ficar translúcida. A seguir, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi submetido a cromatografia de afinidade por níquel como descrito no item III.14.1. A amostra foi eluída e foi realizada a eletroforese em SDS- PAGE das frações obtidas (Fig. 07 A).

Mal80

A) PCR

B) pGEM-T

C) pAE

FIGURA 05 – Clonagem da região Mal80 – **A)** Análise do produto de PCR - a região Mal80 foi amplificada utilizando como molde o DNA genômico de *B. pertussis* e os primers Mal80 e Fha2; **B)** Clonagem no vetor pGEM-T - o fragmento obtido foi ligado ao vetor pGEM-T e analisado através da digestão com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*; **C)** Clonagem no vetor de Expressão pAE – O clone pGEM-TMAL80 # 1 foi digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII* e o fragmento obtido foi ligado ao vetor pAE-Sm14 previamente digerido com as mesmas enzimas e analisado pela rápida extração de DNA e digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII*. PM – DNA do fago lambda digerido com a enzima *HindIII* em kb.

Mal80

EXPRESSÃO

FIGURA 06 - Análise em gel de SDS-PAGE da expressão da região Mal80 no vetor pAE - O clone pAEMAL80 # 2 foi transformado com a cepa de *E. coli* BL21SI e induzido por 2 horas com NaCl 0,3 M. N – não induzido; I – induzido por 2 horas e PM – massa molecular em kDa.

A) Sobrenadante

B) Precipitado

FIGURA 07 – Purificação da proteína recombinante MAL80 em cromatografia de afinidade por níquel – A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade por níquel utilizando a resina “Chelating Sepharose Fast Flow” e eluída com imidazol 0,5 M. As frações obtidas provenientes do sobrenadante **(A)** e do precipitado **(B)** foram analisadas em gel de SDS-PAGE. PM – massa molecular em kDa.

O precipitado obtido após a centrifugação foi ressuspenso, lavado e solubilizado em uréia conforme descrito no item III.14.2. e após este tratamento, a amostra foi submetida a cromatografia de afinidade por níquel. A amostra foi eluída em frações de 1 ml e foi realizada a eletroforese em SDS- PAGE das frações obtidas (Fig. 07 B).

A purificação do sobrenadante, assim como do precipitado, apresentavam majoritariamente a presença da proteína de interesse, porém ou em pequena quantidade ou com purezas insuficientes, o que dificultou a realização de outros experimentos com a proteína MAL80.

2.2. REGIÃO Hep

2.2.1. Amplificação, clonagem, expressão e purificação da região Hep do domínio de ligação à Heparina da proteína FHA de *Bordetella pertussis*

A região Hep foi amplificada através do experimento de PCR utilizando os primers Hep e Fha2 nas condições descritas no item III.3. Uma amostra do PCR foi analisada em gel de agarose para verificarmos a amplificação do fragmento de interesse (Fig. 08 A). A seguir, foi realizada a purificação do produto total da reação do PCR, e tal produto foi ligado ao vetor pGEM-T. Para averiguarmos se as colônias obtidas por transformação continham o fragmento de interesse, foi realizada a rápida extração de DNA (Fig. 08 B), seguida da minipreparação de plasmídeos das colônias (#3, 4, 5, 9 e 10) que apresentaram um tamanho maior do que o controle (vetor pGEM-11Zf(-) 3223 pb Promega). A seguir, foi realizada a digestão simples com a enzima *EcoRI*, sítio de restrição presente no fragmento de interesse e o produto da digestão foi analisado em gel de agarose 1% (Fig 08 B). Foi observado que os clones #3, 4, 9 e 10 continham o fragmento de interesse. O seqüenciamento confirmou a correta clonagem (resultado não mostrado). Estes clones foram então digeridos com as enzimas *HindIII* e *XhoI*, e o fragmento purificado foi ligado ao vetor pAE-Sm14 previamente digerido com as mesmas enzimas. Após a transformação, foi realizada a rápida extração de DNA (Fig. 08 C) da colônia (#7) que apresentou tamanho maior que o controle (vetor pAE) e foi realizada a preparação de plasmídeo. O produto da digestão dupla com as enzimas *HindIII* e *XhoI* foi analisado em gel de agarose 1% (Fig. 08 C). Este clone foi seqüenciado e foi observado que a clonagem estava correta (resultados não mostrados).

O clone que continha o fragmento de interesse em fase com o vetor de expressão pAE (pAEHEP # 7) foi transformado com a cepa BL21SI de *E. coli* e as colônias obtidas foram inoculadas em meio LBON contendo ampicilina até uma D.O.₆₀₀=0,6. Então foi

Hep

A) PCR

B) pGEM-T

Rápida extração de DNA

Digestão com *EcoRI*

C) pAE

Rápida extração de DNA

Digestão Dupla com *XhoI* e *HindIII*

FIGURA 08 – Clonagem da região Hep – **A)** Análise do produto de PCR - a região Hep foi amplificada utilizando como molde o DNA genômico de *B. pertussis* e os primers Hep e Fha2; **B)** Clonagem no vetor pGEM-T - o fragmento obtido foi ligado ao vetor pGEM-T e analisado através da rápida preparação de DNA e digestão com a enzima *EcoRI*; **C)** Clonagem no vetor de Expressão pAE – O clone pGEM-THEP # 3 foi digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII* e o fragmento obtido foi ligado ao vetor pAE previamente digerido com as mesmas enzimas e analisado pela rápida extração de DNA e digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII*. PM – DNA do fago lambda digerido com a enzima *HindIII* em kb.

retirado uma alíquota para controle (não induzido) e foi acrescentado NaCl para uma concentração final de 0,3 M e mantido sob agitação por mais 2 horas, onde foi retirada outra alíquota (induzida). As amostras obtidas foram aplicadas em gel de poliacrilamida contendo SDS e foi observado a indução de uma proteína recombinante de aproximadamente 43 kDa (Fig. 09 A). A seguir, a colônia que apresentava indução (# 9) foi inoculada novamente em meio LBON contendo ampicilina (1 L) para obtermos uma grande quantidade de proteína induzida (Fig 09 B). As condições de indução foram as mesmas descritas acima.

O "pellet" celular obtido foi ressuspenso e submetido a "French Press" até a solução ficar translúcida. A seguir, a amostra foi centrifugada e dividida em sobrenadante e precipitado. O sobrenadante assim como o precipitado solubilizado em uréia foi submetido a cromatografia de afinidade por níquel e as frações obtidas da eluição estão apresentadas na Fig. 10 A e 10 B, respectivamente. Através do gel é possível observar que a purificação do sobrenadante assim como do precipitado, apresentavam majoritariamente a presença da proteína de interesse.

2.2.2. Produção e caracterização de anticorpos anti-HEP

A proteína purificada por cromatografia de afinidade por níquel proveniente do sobrenadante foi dialisada e quantificada (resultado não mostrado), diluída em PBS e injetada (20 µg/animal) em camundongos Balb-C para a obtenção de antisoro anti-HEP.

A análise da titulação e da especificidade do anticorpo contra a proteína recombinante foi realizada por ELISA (Fig. 11 A) e por western-blot (Fig. 11 B). Pelo experimento de ELISA é possível observar que o anticorpo reconhece a proteína de interesse e que o título do anticorpo está ao redor de 1:12800 (diluição do soro que fornece uma leitura maior que 0,1). Através da revelação do filtro de western foi possível observar que a proteína recombinante HEP foi reconhecida pelo anticorpo em todas as diluições utilizadas (1:100, 1:500, 1:1000 e 1:2000) e que a proteína reconhecida é do tamanho esperado (43 KDa).

2.2.2.1. Ensaio de reatividade cruzada

2.2.2.1.1. ELISA

Foi realizado o experimento de reatividade cruzada por ELISA com o intuito de verificar se o anticorpo anti-HEP é capaz de reconhecer além da proteína HEP², a proteína MAL80 e a FHA. Através do gráfico (Fig. 12 A) podemos verificar que o

FIGURA 09 - Análise em gel de SDS-PAGE da expressão da região Hep no vetor pAE- O clone pAEHEP # 7 foi transformado com a cepa de *E. coli* BL21S1 e várias colônias foram induzidas com NaCl 0,3 M **(A)** e a colônia que apresentou melhor indução (#9) foi induzida em maior quantidade **(B)**. 0 – não induzido; I – induzido por 2 horas e PM – massa molecular em kDa.

A) Sobrenadante

B) Precipitado

FIGURA 10 – Purificação da proteína HEP em cromatografia de afinidade por níquel
 – A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade por níquel utilizando a resina “Chelating Sepharose Fast Flow” e eluída com imidazol 0,5 M. As frações obtidas provenientes do sobrenadante **(A)** e do precipitado **(B)** foram analisadas em gel de SDS-PAGE. PM – massa molecular em kDa.

FIGURA 11 – Caracterização do antisoro anti-HEP – A) Gráfico do experimento de ELISA com antisoro anti-HEP. A reação foi realizada como descrita no item III.18. com diferentes concentrações do anticorpo primário (salina ■ e anti-HEP ◆) como visto no gráfico. As absorvâncias mostradas no gráfico correspondem ao valor obtido já descontado o branco. **B)** Experimento de western-blot com antisoro anti-HEP, o filtro foi incubado com anticorpo anti-HEP de *E. coli* na diluição de 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:2000.

FIGURA 12 – Gráfico do experimento de ELISA com antisoro anti-HEP (A) e anti-FHA (B) – Os poços foram sensibilizados com 1 µg/poço das proteínas FHA, MAL80 e HEP purificadas. A reação foi realizada como descrito no item III.18. com diferentes concentrações do anticorpo anti-HEP (A) e anti-FHA (B). As absorbâncias mostradas no gráfico correspondem ao valor obtido já descontado o branco.

anticorpo anti-HEP é capaz de reconhecer as três proteínas (HEP, MAL80 e FHA) em ensaio de ELISA.

O mesmo ensaio foi realizado com o intuito de verificar se o anticorpo policlonal anti-FHA gerado em camundongo pelo Dr. Yuji Sato (NIH - Japão) e cedido pela Dra. Waldely O. Dias do Instituto Butantan, é capaz de reconhecer a proteína recombinante MAL80 e HEP. Através do gráfico (Fig. 12 B) podemos verificar que a anticorpo anti-FHA não é capaz de reconhecer estas duas proteínas.

2.2.2.1.2. Western-blot

Este experimento foi realizado com o intuito de verificar se o anticorpo anti-HEP é capaz de reconhecer a proteína recombinante MAL80 e a FHA em western-blot. Para tanto, as proteínas (MAL80, HEP e FHA) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e depois transferidas para o filtro de nitrocelulose, que foi incubado com o antisoro anti-HEP na diluição de 1:500 e depois revelado. Através do filtro (Fig. 13 A) podemos verificar que a anticorpo anti-HEP é capaz de reconhecer as duas proteínas no tamanho esperado (MAL80 - 57 kDa e FHA - 220 kDa).

Outro experimento de western foi realizado com o intuito de verificar se o anticorpo anti-FHA é capaz de reconhecer as proteínas recombinante MAL80 e HEP. Para tanto, as proteínas (MAL80, HEP e FHA) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e depois transferidas para o filtro de nitrocelulose, que foi incubado com o antisoro anti-FHA na diluição de 1:200 e depois revelado. Através do filtro (Fig. 13 B) podemos verificar que o anticorpo anti-FHA não é capaz de reconhecer nenhuma das duas regiões da proteína FHA (MAL80 e HEP), mas reconhece a proteína FHA.

3. Purificação da FHA

A cultura de *Bordetella pertussis* (20 litros) foi cedida pela Dra. Maria Aparecida Sakauchi do Instituto Butantan e após a centrifugação o sobrenadante foi submetido a cromatografia de afinidade utilizando a resina "Cellufine Sulfate" (Amicon). Após a eluição, a dosagem das frações obtidas foi realizada pelo método de Bradford e as amostras foram analisadas por eletroforese (Fig. 14) e também por ELISA como descrito no item III.22.3 (resultado não mostrado). Foi observado que apesar da FHA ser majoritária ocorre a presença de PT como contaminante.

Com o intuito de separarmos as duas proteínas, foi realizada uma cromatografia de afinidade pela coluna de fetuína e/ou uma gel filtração.

A) Soro anti-HEP

B) Soro anti-FHA

FIGURA 13 – Experimento de western-blot com antisoro anti-HEP (A) e anti-FHA (B)
 – A proteína FHA, MAL80 e HEP foram submetidas a eletroforese de gel de poliacrilamida e transferida para o filtro de nitrocelulose. O filtro foi incubado com anticorpo anti-HEP na diluição de 1:500 (A) e anti-FHA (B) na diluição de 1:200.

FIGURA 14 – Purificação da proteína FHA por cromatografia de afinidade por sulfato
 – A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando a resina “Cellufine Sulfate” e eluída utilizando o tampão 0,01 M de tampão fosfato de sódio contendo 1 M de NaCl e EDTA 5 mM em frações de 10 ml e as frações obtidas foram analisadas em gel de SDS-PAGE M – Massa molecular em kDa.

A gel filtração foi monitorada pela leitura da densidade óptica eluente a 280 nm (Fig. 15 A). A seguir foi realizada a análise das frações obtidas por eletroforese (Fig. 15 B) e foi possível observar a purificação da proteína FHA. Também foi realizado o experimento de ELISA para comprovarmos se houve a separação da PT da FHA e para verificarmos a concentração da amostra tanto na gel filtração como na cromatografia de Fetuína-Sepharose (Fig. 15 C).

4. Caracterização da região Hep

4.1. Afinidade da região Hep por Heparina

As frações que continham o polipeptídio de interesse provenientes da purificação dos corpúsculos de inclusão em coluna de níquel foram diluídas em H₂O (1:10) e a seguir submetidas a coluna de Heparina-Sepharose. Após a lavagem da mesma, a amostra foi eluída em frações de 1 ml com PBS contendo NaCl 0,5 M e 1,5 M em PBS. As frações obtidas da cromatografia foram analisadas em eletroforese em SDS- PAGE (Fig. 16) e foi observado que esta proteína se liga fracamente a heparina.

4.2. Ensaio de Hemaglutinação

Amostras da proteína FHA purificada (25 µl) por cromatografia de Fetuína-Sepharose (fetuína) e por gel filtração (FHA 16, 17 e 18) e da proteína HEP (25 µg) foram diluídas serialmente em placas de fundo em U num volume total de 50 µl. A seguir, as hemácias de ganso recém-preparadas foram misturadas a FHA (1:1) num volume final de 100 µl e deixadas a TA por 2 horas (Fig. 17). Foi utilizado PBS como controle negativo e também utilizamos uma proteína FHA padrão iniciando na concentração de 1 µg/poço. Através do ensaio podemos observar que a proteína FHA purificada neste trabalho possui atividade hemaglutinante, enquanto que a proteína HEP não é capaz de hemaglutinar.

5. TAP EXPRESS

Este método foi utilizado para a obtenção de um produto de PCR recombinante que contivesse um promotor, uma seqüência codificadora e um sinal de terminação que pudesse ser introduzido em animais sem a necessidade da sua clonagem. O TAP *Express* foi escolhido por se tratar de um método rápido e simples, pois em apenas três etapas o DNA já estaria pronto para ser injetado em camundongos para a produção de anticorpos.

FIGURA 15 – Purificação da proteína FHA por gel filtração – A proteína foi purificada na coluna Superdex 200 equilibrada em PBS e conectada a um aparelho de Cromatografia AKTA 10. A cromatografia foi monitorada pela densidade óptica do eluente a 280 nm **(A)** e as frações obtidas foram analisadas em gel de SDS-PAGE **(B)**. **(C)** ELISA “sandwich” das frações obtidas por gel filtração e cromatografia Fetuina-Sepharose. AE – Amostra de entrada e M – Massa molecular em kDa.

FIGURA 16 – Cromatografia de afinidade em Heparina-Sepharose da proteína HEP – A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando a resina “Heparin Sepharose CL-GB” e eluída em PBS contendo NaCl. PM – massa molecular em kDa e AC – amostra de entrada na coluna; 1 a 13 – número das frações obtidas.

FIGURA 17 – Ensaio de hemaglutinação – A proteína FHA purificada por coluna de Fetuína-Sepharose (Fetuína) e por gel filtração (FHA 16, FHA 17 e FHA 18) e a proteína HEP foram misturadas com hemácias de ganso e incubadas a TA por 2 horas. FHA (+) - proteína FHA padrão utilizada como controle positivo e PBS - controle negativo.

5.1. Amplificação dos domínios de ligação à Heparina de FHA e da subunidade S1 da toxina pertússica (PT) de *B. pertussis*

As regiões Hep e S1 de *Bordetella pertussis* foram amplificadas através do experimento de PCR utilizando os primers TAPHEPF / TAPHEPREV e TAPS1F / TAPS1REV, respectivamente, nas condições descritas no item III.19.2. Uma alíquota das reações (5 µl) foi analisada em gel de agarose (Fig. 18 A) para verificarmos a amplificação do fragmento de interesse. A figura mostra que os produtos amplificados apresentam os respectivos tamanhos esperados, 1330 pb para o fragmento Hep e 700 bp para o fragmento S1. Os fragmentos obtidos foram clonados no vetor pGEM-T e submetidos a seqüenciamento, onde foi possível verificar que os fragmentos amplificados eram os fragmentos de interesse e que não houve mutação ou perda de aminoácidos (resultados não mostrados).

A seguir, foi realizado o segundo PCR do método Tap *Express* (item III.19.3) e alíquotas das reações (5 µl) foram analisadas em gel de agarose (Fig. 18 B). Como podemos observar, houve o acréscimo de aproximadamente 1 kb devido a inclusão da região promotora (CMV) e região terminadora (SV40) aos genes de interesse. O DNA foi purificado, quantificado e armazenado a -20°C até sua posterior utilização.

5.2. Transfecção de DNA

Para verificarmos se o sistema funcionava para a expressão de HEP, foi realizada a transfecção de DNA (2 e 5 µg) nas células BHK. O western (Fig. 19) mostrou que ocorreu a expressão de HEP, mostrando a funcionalidade do sistema TAP.

5.3. Obtenção de antisoro

O DNA TAPHEP foi injetado (50 µg/animal) a cada 15 dias em camundongos Swiss fêmea de 14 a 16 g para a obtenção de antisoro anti-HEP como descrito no item III.16. A análise da especificidade do anticorpo contra a proteína recombinante HEP foi realizada por ELISA (Fig. 20) e foi observado que o título de anticorpo aumenta com o número de imunizações.

6. Experimento de Desafio

O experimento de desafio consistiu na imunização de sete grupos de camundongos (12 em cada) Swiss fêmea de 14 a 16 g com DNA e/ou Proteína e o acompanhamento

A) Primeiro PCR

B) Segundo PCR

FIGURA 18 – Análise dos fragmentos dos PCR do TAP *Express* – **A)** Análise dos fragmentos do primeiro PCR do Tap *Express*; **B)** Análise dos fragmentos do segundo PCR do Tap *Express*. PM – DNA do fago lambda digerido com a enzima *HindIII* em kb; 1 – primeiro PCR do TAP *Express* e 2 – segundo PCR do TAP *Express*.

FIGURA 19 – Análise da expressão da proteína Hep em células transfectadas por DNA TAPHEP - O DNA TAPHEP foi transfectado em células BHK e a expressão da proteína foi analisada por western. PM – massa molecular em kDa, C – controle com as células BHK, Hep2 – 2 µg do DNA TAPHEP transfectado e Hep5 – 5 µg do DNA TAPHEP transfectado.

FIGURA 20 – Gráfico do experimento de ELISA com antisoro anti-HEP obtido da imunização com o DNA TAPHEP – Os poços foram sensibilizados com a proteína HEP recombinante purificada. A reação foi realizada com diferentes concentrações do anticorpo primário (salina e anti-HEP das várias imunizações) como visto no gráfico. As absorbâncias mostradas no gráfico correspondem ao valor obtido já descontado o branco.

destes animais após o desafio intra-cerebral com *B. pertussis*. Este é o ensaio aceito pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para se verificar a eficiência de uma vacina contra *Bordetella pertussis*. Os grupos utilizados foram os seguintes:

Grupo 1 – controle negativo, onde foi inoculado apenas salina.

Grupo 2 – controle positivo, onde foi inoculado a vacina DPT (Instituto Butantan) utilizada para imunização em humanos.

Grupo 3 – vacina de DNA TAP S1, onde um fragmento do gene da toxina pertússica (fragmento S1) foi preparado pelo protocolo de TAP e inoculado nos camundongos.

Grupo 4 – vacina de DNA TAP HEP, onde um fragmento do gene FHA (fragmento Hep) foi preparado pelo protocolo de TAP e inoculado nos camundongos.

Grupo 5 – vacina de DNA TAP S1 + DNA TAP HEP, a combinação dos fragmentos S1 e Hep.

Grupo 6 – vacina mista DNA TAP S1 + peptídeo HEP, a combinação do fragmento de DNA S1 mais o peptídeo HEP expresso em *E. coli* e purificado como descrito anteriormente.

Grupo 7 – vacina peptídeo HEP, apenas o peptídeo HEP.

Após a imunização com os diversos candidatos, seguido do desafio intra-cerebral, os camundongos foram monitorados diariamente para verificarmos a sobrevivência dos mesmos, e os resultados estão demonstrados na Fig. 21. Os resultados demonstram que não houve proteção, isto é, que a imunização com a região Hep e/ou S1 na forma de DNA e/ou proteína, conforme descrição acima, não se mostrou eficaz como vacina.

Os antisoros obtidos dos diversos grupos de camundongos imunizados no experimento de desafio foram testados por ELISA para a verificação da produção de anticorpos contra a região Hep (Fig 22 A e B) e S1 (resultados não mostrados). Os resultados mostraram que apenas os grupos imunizados com a proteína recombinante HEP (Grupos 6 e 7) foram capazes de produzir anticorpos contra este domínio.

7. Lactobacilos

7.1. Amplificação e clonagem do domínio Heparina da proteína FHA de *B. pertussis* em *Lactobacilos*

Para esse objetivo, foram utilizados dois vetores, baseados no operon da lactose de *Lactobacillus casei*: O vetor pIA₅lacGFP para expressão intracelular e o vetor pIA₅lac1133PVA para expressão extracelular (Fig. 03 A e B). Os vetores de expressão foram gentilmente cedidos pelo Dr. Gaspar Pérez-Martínez do Instituto de Agroquímica e

Desafio intra-cerebral de *B. pertussis* em camundongos previamente imunizados

GRUPO	Dia da Morte após o Desafio
Grupo 1 – controle negativo	4, 5, 5, 5, 5, 6, 7, >15, >15, >15
Grupo 2 – vacina DPT (controle positivo)	6, 7, >15, >15, >15, >15, >15, >15, >15, >15
Grupo 3 – vacina de DNA TAP S1	5, 5, 6, 6, 7, 7, >15
Grupo 4 – vacina de DNA TAP Hep	5, 5, 5, 5, 6, 6, 6, 7, 13, >15
Grupo 5 – vacina de DNA TAP S1 + DNA TAP Hep	6, 6, 6, 6, 6, 7, 7, 15
Grupo 6 – vacina mista DNA TAP S1 + peptídeo Hep	4, 5, 5, 5, 7, 7, 8, 8, 15
Grupo 7 – vacina peptídeo Hep	5, 6, 6, 6, 7, 7, 8

FIGURA 21 – Experimento de Desafio intra-cerebral com *B. pertussis* – Sete grupos de camundongos Swiss fêmea foram imunizados com DNA e/ou proteína e a seguir desafiados com *B. pertussis*. **A)** Tabela mostrando o dia da morte dos camundongos após o desafio; **B)** Curva de Sobrevivência dos camundongos submetidos ao desafio.

FIGURA 22 – Gráfico do experimento de ELISA com os antisoros obtidos no experimento de Desafio – Os poços foram sensibilizados 1 μ g/poço da proteína HEP recombinante purificada. A reação foi realizada como descrita no item III.18. com diferentes concentrações dos antisoros obtidos na primeira (A) e na segunda sangria (B). As absorbâncias mostradas no gráfico correspondem ao valor obtido já descontado o branco.

Tecnologia de Alimento (CSIC, Valência, Espanha). Estes vetores possuem um gene clonado, sendo então necessária a substituição destes genes pelos genes de interesse. O vetor pA₅lacGFP (8000 pb) contém o cDNA da "Green Fluorescent Protein" (GFP) com 8000 pb e o vetor pA₅lac1133PVA (9600 pb) contém o cDNA da proteína VP8 de rotavírus com 1,2 kb.

Os vetores pA₅lacGFP e pA₅lac1133PVA foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI e *Bam*HI e *Kpn*I, respectivamente, sendo que as extremidades *Eco*RI de um vetor e *Kpn*I do outro foram preenchidas por tratamento com a enzima Klenow na presença de dNTPs, formando extremidades não coesivas.

A região Hep de *Bordetella pertussis* foi amplificada através do experimento de PCR utilizando os primers LACHEPF / LACHEPREV e como molde o vetor pGEM-T que continha a região de interesse (pGEM-THEP #3) nas condições descritas no item III.23.1. Uma alíquota das reações (5 µl) foi analisada em gel de agarose (Fig. 23 A) para verificarmos a amplificação do fragmento de interesse. Após a purificação do DNA este foi ligado ao vetor pGEM-T e as colônias obtidas por transformação foram analisadas através da rápida extração de DNA (Fig. 23 B). O seqüenciamento confirmou que o clone pGEM-TLACHEP # 1 continha o fragmento de interesse (resultado não mostrado). O clone foi então digerido com a enzima *Eco*RI e tratado com a enzima Klenow para a obtenção de extremidade não coesiva. O DNA foi precipitado, purificado e digerido com a enzima *Bgl*II para sua clonagem nos vetores de interesse previamente digeridos como descrito acima.

Para a análise da clonagem da região Hep nos vetores de Lactobacilos foi realizado PCR de colônias de *E. coli* DH5α (resultado não mostrado) e os clones que eram maiores do que o controle foram analisados por digestão.

Quando o vetor pA₅lacGFP é digerido com a enzima *Bam*HI, este libera um fragmento de aproximadamente 500 pb (sítio de restrição para *Bam*HI presente no vetor e no inserto). Entretanto nos transformantes que contiverem o fragmento de interesse haverá apenas um sítio de *Bam*HI (presente no fragmento de interesse), linearizando o vetor. Há apenas um sítio de *Bam*HI pois com a clonagem foi perdido o sítio de *Bam*HI presente no vetor de origem, tendo em vista que a clonagem foi feita com *Bam*HI (sítio presente no vetor original) e *Bgl*II (sítio presente no fragmento amplificado). Consideramos clones positivos aqueles que apresentaram um tamanho de aproximadamente 9,3 kb e portanto maiores do que o vetor digerido (7,5 kb). Através da análise do gel foi possível observar que os clones pA₅lacGFPHEP #3, 4, 5, 6 e 7 (Fig. 24 A) continham o fragmento de interesse.

A) PCR

B) Clonagem no pGEM-T

FIGURA 23 – Clonagem da região Hep – **A)** Análise do produto de PCR - a região Hep foi amplificada utilizando como molde o DNA genômico de *B. pertussis* e os primers LACHEPF e LACHEPREV; **B)** Clonagem no vetor pGEM-T - o fragmento obtido foi ligado ao vetor pGEM-T e analisado através da rápida preparação de DNA.

A) Clonagem no vetor pIA₅lacGFP- intracelular

B) Clonagem no vetor pIA₅lac1133PVA - extracelular

FIGURA 24 – Clonagem da região HEP nos vetores de Lactobacilos - O fragmento Hep foi clonado nos vetores pIA₅lacGFP (A) para expressão extracelular e pIA₅lac1133PVA (B) para expressão intracelular e analisados pela digestão com a enzima de restrição *Bam*HI. V – vetor e PM – DNA do fago lambda digerido com a enzima *Hind*III em kb.

O vetor pIA₅lac1133PVA quando digerido com a enzima *Bam*HI é linearizado (~9,6 kb) e quando digerido com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I libera um fragmento de 1,2 kb. Para analisarmos os transformantes, foi realizada a digestão do vetor original com a enzima *Bam*HI e com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I. Os transformantes obtidos foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I, com isso, o clone que apenas linearizar deve conter o fragmento de interesse (fragmento possui 1 sítio de *Bam*HI e não tem sítio para *Kpn*I). Através da Figura 24 B observamos que todos os clones foram positivos. O clone pIA₅lac1133PVAHEP #11 foi selecionado para estudos posteriores.

Estes vetores foram transferidos para *L. casei* (cepa BL155) via eletroporação conforme descrito no item III.23.3 e os transformantes obtidos foram expressos.

7.2. Expressão

7.2.1. Expressão intracelular

Após a eletroporação do clone pIA₅lacGFPHEP # 3, foi realizado o crescimento das colônias em meio contendo glicose (condição não induzida) ou ribose (condição induzida) e a expressão das mesmas foi analisada por “western-blot” (Fig. 25 A) e foi possível observar que ocorreu a indução das colônias 1 e 3.

7.2.2. Expressão extracelular

Após a eletroporação do vetor pIA₅lac1133PVAHEP # 11 em *Lactobacilos* foram escolhidas ao acaso 3 colônias isoladas que cresceram na placa de MRS e foi realizada a indução destas conforme descrito no item III.23.4. Após o crescimento das colônias em meio contendo glicose (condição não induzida) ou ribose (condição induzida), a expressão das mesmas foi analisada por “western-blot” (Fig. 25 B) e foi observado uma indução basal. A banda obtida é maior do que o tamanho esperado (~64 kb), uma indicação de que não ocorreu o processamento da sequência sinal (20902 Da).

7.3. Obtenção de antisoro

A linhagem BL155 que expressa o antígeno Hep (intracelular) foi utilizada para a imunização nasal e subcutânea de camundongos. Também foi utilizado CTB (subunidade B da toxina colérica) como adjuvante cedido pela aluna de doutorado Ana Paula M. Arêas (IQ-USP). Os grupos utilizados foram os seguintes: salina, BL155, BL155 mais CTB, HEP e HEP mais CTB.

A) Expressão Intracelular

B) Expressão Extracelular

FIGURA 25 - Análise em gel de SDS-PAGE da expressão da região Hep nos vetores de Lactobacilos - **A)** Expressão intracelular do clone pIA₅lacGFPHEP3; **B)** Expressão extracelular do clone pIA₅lac1133PVAHEP11. C – controle negativo (BL155); N – não induzido (meio contendo glicose); I – induzido (meio contendo ribose) e PM – massa molecular em kDa.

O sangue e a saliva dos animais foram coletados para a análise da presença de IgG ou IgA específicas para cada antígeno. No caso das imunizações pela via nasal não foi observada a produção de anticorpos (IgG ou IgA) (resultados não mostrados). Nos grupos onde foram realizadas imunizações pela via subcutânea foi observada a presença de antisoro apenas no grupo onde foi usado CTB como adjuvante (Fig. 26).

8. Ensaio de inibição de hemaglutinação

A proteína FHA purificada (0,5 µg/poço) foi incubada com diluições seriadas do antisoro anti-HEP produzido em *E. coli*, *Lactobacilos* e pelo método Tap *Express* (DNA TAP HEP) e mantida por duas horas a 37°C. A seguir, as hemácias de ganso recém-preparadas foram misturadas e incubadas por duas horas a TA. Foi utilizado o anti-FHA e heparina como controle positivos da inibição da hemaglutinação. Como controle da hemaglutinação, utilizamos a proteína FHA na ausência de antisoro como controle positivo e PBS como controle negativo.

Através do experimento (Fig. 27) podemos observar que os anti-soros anti-HEP são capazes de inibir a hemaglutinação até uma diluição 1/4096.

FIGURA 26 – Gráfico do experimento de ELISA com antisoro anti-HEP obtido pela imunização com Lactobacilos via subcutânea– Os poços foram sensibilizados com 1µg/poço da proteína HEP recombinante purificada. A reação foi realizada como descrita no item III.18. com diferentes concentrações do anticorpo primário como observado no gráfico. As absorvâncias mostradas no gráfico correspondem ao valor obtido já descontado o branco. BL155 – linhagem de lactobacilos e CTB – subunidade B da toxina colérica.

FIGURA 27 – Ensaio de inibição de hemaglutinação - Diluições seriadas do antisoro anti-HEP produzido em *E. coli*, lactobacilos (LAC) e pelo método *Tap Express* (DNA TAP) foram incubados com a proteína FHA (0,5 µg/poço). A seguir, hemácias de ganso foram misturadas e incubadas por duas horas a TA. Controles positivos da inibição da hemaglutinação: anti-FHA e heparina. (+) FHA - proteína FHA na ausência de antisoro e (-) PBS como controle negativo.

V – DISCUSSÃO

A vacina contra a coqueluche, atualmente utilizada no programa de vacinação no Brasil pela FUNASA, é a vacina tríplice bacteriana (DTP). A vacina consiste da bactéria *Bordetella pertussis* inativada por tratamento com formalina combinada com os toxóides tetânico e diftérico. Esta vacina foi implementada ao redor do mundo a partir da década de 40 e a sua taxa global de cobertura está em torno de 80 % (WHO 1999). A DTP, vacina recomendada pela OMS, é eficaz, tendo eliminado a mortalidade advinda desta doença nos países aonde vem sendo utilizada (Rappuoli e cols., 1992).

No entanto, a eficácia da vacina pode ser bastante variável, dependendo do produto, das condições e da forma de estudo. Recentemente, ocorreram problemas de imunogenicidade com vacinas produzidas nos Estados Unidos e testadas na Europa. Estudos clínicos realizados na Suécia e na Itália, demonstraram uma eficiência inferior do que o esperado, 48 % e 36 %, respectivamente (Greco e cols., 1996 e Gustafsson e cols., 1996). Outro problema relacionado à vacina são as reações adversas. Apesar destas reações não serem específicas da *B. pertussis*, tais reações ocorrem com mais frequência na vacina tríplice (DTP), do que na dupla (DT) (Cody e cols., 1981). Devido a necessidade de uma vacina que apresentasse uma maior tolerabilidade, foram produzidas vacinas acelulares contra coqueluche. As vacinas acelulares contêm apenas componentes da bactéria relevantes para a proteção, diminuindo desta maneira a presença de produtos bacterianos indesejáveis, como os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede bacteriana. A vacina acelular contém menos endotoxinas e, conseqüentemente, ocorre uma diminuição nas reações adversas.

As vacinas acelulares foram licenciadas no Japão desde 1981 para crianças acima de 2 anos e desde 1990 para recém-nascidos. No Japão, em 1988, dois tipos de vacinas acelulares estavam sendo produzidas, a do tipo B (Biken) e T (Takeda). A vacina do tipo B possui quantidades iguais de PT e FHA, enquanto que a do tipo T possui FHA em maior quantidade e outros componentes como a fímbria (Kimura & Kuno-Sakai, 1988 e Sato & Sato, 1988). Existem hoje no mercado diversas vacinas acelulares que são compostas pela associação de um ou mais antígenos purificados do extrato total da bactéria relacionados com os mecanismos de patogenicidade e proteção (Jadhav & Gairola, 1999).

Nos países desenvolvidos, a vacina DTP celular tem sido substituída pela acelular. No entanto, a decisão da introdução de uma nova vacina não é definida apenas por dados clínicos, é preciso levar em conta a realidade sócio-econômica do país. Por isso, em diversos países, incluindo o Brasil, a vacina celular é mantida nos programas públicos de vacinação. Apesar desta vacina apresentar uma série de reações adversas, não existe registro de seqüelas, além de ser altamente eficiente e economicamente acessível. A dose da vacina celular produzida no Brasil custa R\$ 0,20, enquanto que a dose da acelular nas clínicas particulares de vacinação custa em média R\$ 100,00.

O Instituto Butantan tem buscado desenvolver uma vacina acelular (Dias e cols., 2002) utilizando o filtrado de cultivo de *Bordetella pertussis*, um subproduto da produção da vacina celular tradicional, em conjunto com diferentes adjuvantes como o hidróxido de alumínio, vitamina A, frações solúveis de *B. pertussis* ou surfactante pulmonar.

Crianças infectadas com *B. pertussis* ou imunizadas com a vacina celular produzem IgG anti-FHA (Redd e cols., 1988 e Amsbaugh e cols., 1993). Altos títulos de IgA anti-FHA também foram detectados na secreção nasal de pacientes convalescentes após a infecção pela bactéria (Long e cols., 1990 e Thomas e cols., 1990). Estes dados sugerem a importância da presença da proteína FHA nas vacinas acelulares.

Apesar da presença de FHA inteira nas vacinas acelulares ser eficiente (Watanabe e cols., 2002), vários grupos tem buscado domínios antigênicos para serem utilizados como componentes de vacinas acelulares (Di Tommaso e cols., 1991; Leininger e cols., 1997; Wilson e cols., 1998; Piatti, 1999). A utilização de componentes purificados a partir de extrato de *Bordetella pertussis* pode acarretar na contaminação de produtos co-purificados indesejados como o LPS. Além disso, a FHA é uma proteína instável e tende a sofrer degradação mesmo nas preparações de melhor qualidade (Corbel e cols., 1999). Outra desvantagem de trabalhar com as vacinas acelulares utilizadas até o momento é a necessidade do cultivo de *Bordetella pertussis*, uma bactéria patogênica e de crescimento lento (Piatti, 1999).

Neste trabalho resolvemos estudar o domínio de ligação a heparina (aminoácidos 442 a 863) proposto por Hannah e colaboradores (1994) como um possível antígeno vacinal. Este domínio foi descrito como o responsável pela ligação de FHA aos glicolípídeos sulfatados presentes na superfície das células epiteliais (Menozzi e cols., 1994). Anticorpos produzidos contra esta região poderiam evitar a adesão da bactéria nas células epiteliais do trato respiratório. Estudos realizados por Wilson e colaboradores (1998) sugerem que a região que compreende os aminoácidos 494-619 pode ser um

candidato para a produção de anticorpos protetores. Esta região faz parte do domínio de ligação a heparina, região que denominamos região Hep (aa 442-873). O nosso objetivo foi de avaliar o domínio Hep como um antígeno vacinal pela sua expressão e apresentação utilizando três sistemas distintos, a expressão em *E. coli*, na forma de vacina de DNA e em sistema de lactobacilos.

A expressão das regiões Mal80 e Hep em *E. coli* só foi possível com a utilização da cepa BL21SI. As outras cepas utilizadas, BL21(DE3), BL21 (DE3)Star e BL21(DE3)CodonPlus-RP, não apresentaram a expressão da proteína recombinante, enquanto que a cepa BL21(DE3)pLysS apresentou baixa expressão. Estes dados sugerem que as proteínas recombinantes MAL80 e HEP são tóxicas para a bactéria, uma vez que só observamos a indução das proteínas nas cepas onde não ocorre a expressão basal na ausência do indutor. Convém ressaltar que utilizando a cepa BL21SI a uma temperatura de 30°C em comparação com a cepa BL21(DE3)pLysS, houve um aumento da solubilidade da proteína (resultados não mostrados), conforme já havia sido descrito para as subunidades α e α^{70} da RNA polimerase (Bhandari & Gowrishankar, 1997).

Após a indução da expressão das proteínas em *E. coli* utilizando o vetor pAE que possui uma cauda de 6 histidinas, foi realizada a purificação das mesmas por cromatografia de afinidade por níquel tanto da proteína solúvel como da presente nos corpúsculos de inclusão.

A purificação do sobrenadante assim como do precipitado da proteína MAL80 na coluna de níquel apresentaram majoritariamente a presença da proteína de interesse. No entanto, a proteína MAL80 foi obtida em pequena quantidade e/ou com pureza insuficiente, o que impossibilitou a produção de anticorpos e outros estudos. Outros métodos como cromatografia de afinidade por Heparina-Sepharose e gel filtração (resultados não mostrados) foram realizados com a intenção de melhorar a purificação da proteína MAL80, mas não foi obtido nenhum sucesso. Por este motivo, foi descontinuado o seu estudo.

A purificação da proteína recombinante HEP foi realizada da mesma forma que a proteína MAL80. Entretanto, foi obtida uma quantidade maior de proteína e por densitometria do gel de SDS-PAGE das amostras obtidas da purificação do sobrenadante foi constatado que a proteína HEP compreendia 90 % do total de proteínas.

Para averiguarmos a afinidade da proteína HEP por heparina, foi realizada a cromatografia de afinidade utilizando a resina Heparina-Sepharose conforme descrito por Hannah e colaboradores (1994). Neste trabalho, a afinidade das proteínas recombinantes

foi calculada comparando a quantidade de proteína coletada no eluato em comparação com a concentração de proteína antes da cromatografia (Fig. 28). Através da cromatografia foi observado que a proteína HEP possui uma baixa afinidade por este composto, pois só foi coletado 18 % da proteína HEP no eluato. Este dado não confirma a hipótese proposta por Hannah e colaboradores (1994) de que a região de ligação a heparina da proteína FHA está contida na porção de Mal80 que não contém Mal2, isto é, de que o domínio de ligação a heparina vai do aminoácido 442 a 863 (região Hep). Esta dedução é baseada no fato de que a proteína correspondente aos aminoácidos 299 a 863 da proteína FHA (região Mal80) tem uma afinidade por heparina (90 %) bem maior do que a proteína correspondente aos aminoácidos 16 a 441 (região Mal2) (9 %), como podemos observar na Figura 28. Baseado nesta informação acreditava-se que a região Mal2 não seria importante para a ligação de FHA a heparina.

Existem duas hipóteses para explicar os dados apresentados nesta tese. A primeira é que a conformação adquirida pela proteína recombinante HEP não possibilita a sua ligação a heparina, sendo necessária a presença de parte da região Mal2.

A outra hipótese é que tanto a região Mal2 quanto à região Hep apresentam sítios de ligação a heparina. No entanto, estes sítios quando isolados, possuem baixa afinidade por heparina. Esta hipótese é sustentada pelo modelo tridimensional da proteína FHA proposto por Kajava e colaboradores (2001) (Fig. 29), segundo o qual pressupõe que a região Mal80 é formada por repetições de 19 aminoácidos formadas por três folhas β pregueadas, separadas por regiões em curva formando um anel (Fig. 29). Por este modelo os aminoácidos expostos participariam da ligação desta proteína a seus receptores. É possível observar tanto em Mal2 quanto em Hep a presença de resíduos básicos (arginina (R) e lisina (K)) nas posições referentes a estes aminoácidos expostos (Fig. 30). Estes resíduos podem estar participando da ligação da proteína FHA com heparina, tendo em vista que estes aminoácidos estão presentes em vários outros domínios de ligação a heparina em diferentes proteínas (El-Sheikh e colaboradores, 2002).

Com o intuito de verificarmos se a proteína HEP mantém a atividade de hemaglutinação, experimentos de aglutinação de hemácias de ganso foram realizados. Como controle positivo utilizamos a proteína FHA purificada de cultura de *B. pertussis*. Através deste experimento foi possível observar que a proteína HEP não tem a capacidade de hemaglutinar, sugerindo que a proteína recombinante não possui o(s) sítio(s) de ligação às hemácias.

FIGURA 28 – Ensaio de atividade de ligação a heparina da proteína FHA e das proteínas de fusão realizado por Hannah e cols. (1994) – As proteínas recombinantes expressas no vetor MalE (Mal2, Mal80, Mal83 e Mal85), assim como a proteína FHA e a amilose MalE foram submetidas a coluna Heparina-Sepharose e eluídas com NaCl 0,5 M. Os valores indicam a quantidade relativa de proteína recuperada após a eluição comparada com a quantidade presente na amostra de entrada.

FIGURA 29 – Modelo tridimensional da proteína FHA proposto por Kajava e colaboradores (2001) – A) Modelo tridimensional da proteína FHA mostrando suas 5 regiões ricas em folhas β -pregueadas (B0, R1, B1, R2 e B2). **B)** Alinhamento da sequência consenso das repetições que formam a região R1 da proteína FHA. **C)** Esquema do arranjo dos aminoácidos da região R1. **D)** Diagrama mostrando a posição das folhas β pregueadas da região R1.

REGIÃO R1

A) Mal2

```

364  V N V A G G G A V K I A S A S S V G N
      L A V Q G G G K V Q A T L L N A G G T
      L L V S G R Q A V Q L G A A S S R Q A
412  L S V N A G G A L K A D K L S A T R R

```

B) Hep

```

458  L S V R A G G A L K A G K L S A T G R
      L D V D G K Q A V T L G S V A S D G A
      L S V S A G G N L R A N E L V S S A Q
515  L V V R G Q R E V A L D D A S S A R G

```

C) Consenso

```

L X V X A G G A V X L X X L X S X G X
      G X X X L  A    A    A    X

```

FIGURA 30 – Região de repetição de aminoácidos (Região R1) – Identificação dos motivos que contêm 19 resíduos na região Mal2 (A) e Hep (B) e o respectivo consenso (C). Os aminoácidos expostos estão sombreados. Os resíduos básicos arginina (R) e lisina (K) estão em vermelho.

A proteína HEP purificada do sobrenadante foi utilizada para a produção de anticorpos pela imunização via i.p. em camundongos Balb-C. O título do antisoro obtido foi de 1:12800 (diluição que fornece uma leitura maior que 0,1). Este soro foi utilizado posteriormente para o monitoramento da expressão da proteína HEP nos outros sistemas de expressão.

Com o intuito de caracterizar o antisoro anti-HEP, foi realizado o experimento de ELISA onde foi demonstrado que o antisoro anti-HEP é capaz de reconhecer além da proteína HEP, a proteína MAL80 e a FHA. No entanto, o antisoro anti-FHA não é capaz de reconhecer nem a proteína MAL80, nem a HEP, apenas a proteína FHA. A FHA é uma proteína de 220 kDa e, possivelmente, o soro obtido quando esta proteína foi inoculada não gerou anticorpos para todos os seus domínios, inclusive para o domínio de ligação a heparina. Para comprovarmos este resultado, foram realizados experimentos de Western para a visualização das bandas reconhecidas pelos antisoros. Os resultados demonstram que o antisoro anti-HEP reconhece a proteína recombinante HEP do tamanho esperado, assim como a proteína MAL80 e a proteína FHA, mas que o antisoro anti-FHA só é capaz de reconhecer a própria proteína FHA. Convém ressaltar que além da banda esperada de FHA (220 kDa), tanto o anticorpo anti-HEP como o anti-FHA reconhecem outras bandas devido à degradação da proteína, só que de tamanhos diferentes; de aproximadamente 150 kDa e 170 kDa, respectivamente.

A imunogenicidade da proteína FHA foi estudada através de diferentes métodos. Estudos realizados por Leininger e colaboradores (1997), utilizando anticorpos monoclonais e soro humano de pessoas convalescentes ou imunizadas, identificaram uma principal região imunodominante na região C-terminal. O sítio de ligação da maioria dos anticorpos (14 de 23) estava localizado entre os aminoácidos 2001 e 2015 (RGHTLESAEGRKIFG). Este dado confirma os estudos realizados por Wilson e colaboradores (1998), que analisando a afinidade de fagos expressando peptídeos da proteína FHA a anticorpos policlonais anti-FHA produzidos em coelho com a proteína FHA nativa e denaturada, identificaram os resíduos 1929-2019 como o epitopo mais imunodominante de FHA. Esta região possui cerca de 20 % dos clones seqüenciados, sendo que estes clones são fortemente reconhecidos pelos anticorpos produzidos contra a FHA nativa e denaturada, sendo esta ligação inibida pela proteína FHA nativa. Entretanto, neste mesmo trabalho, foi demonstrado que mais da metade dos clones seqüenciados pertenciam à porção N-terminal e que a seqüência ₅₈₆SAARGADISG₅₉₅ estava presente em todos estes clones. O caráter repetitivo da região N-terminal pode

dificultar o mapeamento preciso de epitopos. Outro estudo realizado, analisando a especificidade do soro de pessoas convalescentes por diferentes porções da proteína FHA, indicou a presença de um epitopo imunodominante correspondendo aos aminoácidos 1927-2266 (Piatti, 1999).

Analisando os resultados destes três trabalhos podemos concluir que a região imunodominante da proteína FHA está presente na porção C-terminal, fato que explicaria o não reconhecimento da proteína HEP pelo anticorpo policlonal anti-FHA.

Apesar disto, o antisoro anti-HEP obtido a partir de animais imunizados com a proteína HEP produzida em *E. coli* foi capaz de inibir a hemaglutinação por FHA. Este bloqueio da ligação pode estar ocorrendo devido à proximidade da ligação dos anticorpos aos sítios responsáveis pela hemaglutinação, ou por uma mudança conformacional promovida pela ligação dos anticorpos anti-HEP na região Hep.

Paralelamente, com a finalidade de averiguar o efeito protetor do domínio Hep, foi testada uma vacina de DNA obtida pela amplificação do domínio Hep e da subunidade S1 da toxina pertússica de *Bordetella pertussis*, através do método de TAP Express. Este método permite a obtenção de DNA sem a necessidade de sua clonagem, pois o produto final do PCR já contém uma região promotora (CMV), uma seqüência codificadora e uma região terminadora (SV40).

Antes de iniciarmos as imunizações, foi realizada a transfecção do DNA TAPHEP em células BHK para nos certificarmos que a proteína HEP seria expressa neste sistema. A imunização em camundongos Balb-C utilizando o DNA obtido através do método de TAP Express também foi capaz de produzir anticorpos no mesmo título obtido pela imunização com a proteína HEP expressa em *E. coli* (1:12800). Através de dados preliminares, foi possível observar que a produção de anticorpos ocorre apenas quando o intervalo entre as imunizações é de duas semanas ao invés de uma (resultados não mostrados). Além disso, o título dos antisoros produzidos se mostrou diretamente proporcional ao número de inoculações.

De posse do material para a vacina de DNA e da proteína recombinante HEP, foi efetuado o experimento de desafio com *Bordetella pertussis*. O experimento de desafio consistiu na imunização de grupos de camundongos com DNA e/ou proteína e o acompanhamento destes animais após o desafio intra-cerebral com *B. pertussis*. Após a imunização com os diversos candidatos, seguido do desafio intra-cerebral e monitoramento dos camundongos, foi observado que nenhum dos candidatos testados foi capaz de proteger os animais contra *B. pertussis*. Os antisoros obtidos dos diversos

grupos de camundongos imunizados no experimento de desafio foram testados por ELISA para a verificação da produção de anticorpos contra a região Hep e S1. Os resultados mostraram que apenas os grupos imunizados com a proteína recombinante HEP foram capazes de produzir anticorpos contra este domínio.

A ausência de anticorpos para a região Hep e S1 nos camundongos imunizados com os DNAs referentes a estas regiões já era esperado tendo em vista que foram efetuadas apenas duas imunizações, número insuficiente para a produção dos anticorpos. O título do anti-HEP após a segunda imunização ainda é muito baixo (1:200) quando comparado com o da quarta imunização (1:12800). Os anticorpos desta quarta imunização foram neutralizar a atividade de hemaglutinação da proteína FHA. Convém ressaltar que não é possível imunizar mais vezes os camundongos, pois para o desafio intra-cerebral, pois o ensaio não pode ser realizado em camundongos com mais de 45 dias de vida e este é o ensaio aceito pela OMS para desafio com *Bordetella pertussis*.

Experimentos realizados por Canthaboo e colaboradores (2001) demonstraram que a proteção contra o desafio intra-cerebral é maior quando os animais são imunizados com vacinas celulares (90 % de proteção) do que acelulares (40 % de proteção). Por este motivo, vários autores utilizam outro tipo de desafio para o teste de vacinas acelulares, o desafio por aerosol (Xing e cols., 1999).

Grande parte dos microorganismos patogênicos, inclusive *Bordetella pertussis*, iniciam sua infecção através da mucosa de vários órgãos (trato respiratório, intestinal e urogenital). Devido a este fato, medidas eficientes contra estes microorganismos requerem o desenvolvimento de novas vacinas, as quais seriam capazes de induzir proteção local com o intuito de neutralizar o patógeno no início da infecção, como no caso das vacinas de mucosas.

A administração de antígenos por via oral ou nasal requer a utilização de um vetor para a sua apresentação ao sistema imune. Atualmente, os vetores utilizados são organismos patogênicos atenuados, como BCG, *Salmonella*, *Bordetella* e *Vibrio*. Uma via alternativa de apresentação de antígenos para vacinas de mucosas são os lactobacilos.

Entre os antígenos expressos em lactobacilos o melhor caracterizado é o fragmento C da toxina tetânica. A expressão deste antígeno foi realizada utilizando duas linhagens de bactérias lácticas (*L. plantarum* e *L. lactis*) em diferentes vetores de expressão. Os lactobacilos recombinantes foram comparados quanto à capacidade de estimulação do sistema imune em diferentes linhagens de camundongos através da produção de IgG e IgA e por diversas vias de inoculação (Maassen e cols., 1999;

Grangette e cols., 2001 e 2002 e Reveneau e cols., 2002). Todas as vias de inoculação (sub-cutânea, intra-gástrica, oral e nasal) se mostraram eficazes na indução da resposta humoral. Também foi demonstrado que a imunização oral ou nasal com lactobacilos recombinantes expressando este antígeno induz resposta protetora em desafios contra a toxina tetânica (Grangette e cols., 2001 e 2002).

A proteína HEP foi expressa em *Lactobacillus casei* utilizando um vetor de expressão intracelular induzida por ribose. A utilização deste organismo como vetor vacinal é recente e existem poucos antígenos expressos neste sistema, dentre eles, além do fragmento C da toxina tetânica, o antígeno protetor de *Bacillus anthracis* e a subunidade B da toxina colérica (Slos e cols, 1998 e Zegers e cols., 1999). No nosso caso, a escolha para o uso deste sistema se baseou nos resultados de Isolauri que mostraram uma ação adjuvante de *L. casei* quando co-inoculado com rotavírus (Isolauri e cols., 1995).

Outros antígenos importantes no desenvolvimento de vacinas contra diferentes doenças foram clonados em lactobacilos em nosso laboratório, sendo que já foram expressos três antígenos (PsaA, PspA c1 e PspA c3) de *S. pneumoniae* em *Lactobacillus casei* (Oliveira e cols., submetido).

Após a expressão da região Hep em lactobacilos, foi realizada a imunização de camundongos para averiguarmos a resposta humoral contra a proteína HEP. O protocolo de imunização nasal para lactobacilos ainda não está definido, mas de acordo com artigos recentes da literatura (Grangette e cols., 2002) e comunicação pessoal com o grupo do Dr. Gaspar Pérez-Martínez, a inoculação deve ser realizada por 3 dias consecutivos a cada 3 semanas (9 doses no total). Entretanto, apesar de utilizarmos este protocolo, não observamos a presença de IgG nem de IgA nos camundongos imunizados por esta via.

Uma explicação para não termos observado a produção de anticorpos é o fato de termos utilizado um vetor induzível por ribose ao invés de um constitutivo. O fato de não haver o açúcar indutor a partir do momento em que as bactérias são inoculadas no animal pode acarretar na diminuição da expressão e apresentação da proteína recombinante.

Com o intuito de verificarmos se a quantidade de proteína acumulada no interior das bactérias é capaz de estimular o sistema imune, resolvemos imunizar os camundongos pela via sub-cutânea, e foi observada a produção de anticorpos anti-HEP. No entanto, o título obtido com este sistema foi baixo (1:200) quando comparado com os outros dois sistemas apresentados anteriormente (1:12800). Importante ressaltar que só

foi observada a produção de anticorpos quando foi utilizada a subunidade B da toxina colérica como adjuvante.

O experimento de inibição de hemaglutinação promovida por FHA mostrou que além do antisoro anti-HEP produzido contra a proteína expressa em *E. coli*, do antisoro produzido por DNA e dos antisoros produzidos usando lactobacilos recombinantes, também foram capazes de inibir a ligação de FHA às hemácias, da mesma maneira que o antisoro anti-FHA. No entanto, o antisoro anti-FHA é mais eficiente nesta inibição, sugerindo que outras regiões além da região Hep são importantes para esta ligação.

No conjunto, os resultados obtidos e apresentados nesta tese demonstram que a proteína HEP não possui uma alta afinidade por heparina como sugerido por Hannah e colaboradores (1994), indicando que o sítio de ligação a heparina não está restrito a esta região.

A região Hep expressa nos três sistemas foram capazes de produzir anticorpos quando inoculada em camundongos, no entanto, o título do antisoro anti-HEP obtido a partir da inoculação de lactobacilos foi inferior aos obtidos pelos outros sistemas.

Apesar da região Hep ser imunogênica, esta proteína recombinante não é eficaz como antígeno vacinal nas condições experimentais testadas. No entanto, o fato de anticorpos produzidos contra este domínio inibirem a hemaglutinação promovida por FHA, sugere que novos estudos deverão ser realizados para se definir se este domínio pode ser ou não considerado um antígeno vacinal, através do uso de outros ensaios de desafio, como a inoculação de *Bordetella pertussis* por aerosol, o uso de adjuvantes para o aumento da resposta imune, entre outras possibilidades.

VI - CONCLUSÕES GERAIS

1. O domínio Hep foi clonado e expresso em *E. coli*, no sistema TAP Express e em lactobacilos.
2. Os três sistemas de expressão foram capazes de produzir anticorpos em camundongos, no entanto, o título obtido utilizando lactobacilos (1:200) foi menor do que nos outros sistemas (1:12800).
3. A proteína HEP purificada de *E. coli* possui baixa afinidade por heparina e não é capaz de aglutinar hemácias.
4. O anticorpo anti-HEP produzido em *E. coli* foi capaz de reconhecer a proteína FHA. No entanto, o anticorpo anti-FHA não reconheceu a proteína HEP.
5. No experimento de desafio com *Bordetella pertussis* utilizando vacina de DNA e/ou proteína HEP observamos que nenhum candidato conferiu proteção.
6. Os anticorpos produzidos nos camundongos imunizados com a proteína HEP expressa em *E. coli*, lactobacilos recombinantes e por vacina de DNA, foram capazes de inibir a hemaglutinação promovida pela proteína FHA.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amsbaugh, D.F.; Li, Z.M. & Shahin, R.D. (1993) Long-lived respiratory immune response to filamentous hemagglutinin following *Bordetella pertussis* infection. *Infect. Immun.* **61**:1447-1452.
- Anderson, R.; Gao, X.; Papakonstantinou, A.; Roberts, M. & Dougan, G. (1996) Immune response in mice following immunization with DNA encoding fragment C of tetanus toxin. *Infect. Immun.*, **64**(8): 3168-3173.
- Arico, B.; Nuti, S.; Scarlato, V. & Rappuoli, R. (1993) Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9204-9208.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. & Struhl, K. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, 2 Vols, John Wiley & Sons, USA.
- Barbieri, J.T.; Rappuoli, R. & Collier, R.J. (1987) Expression of the S-1 catalytic subunit of pertussis toxin in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55**: 1321-1323.
- Beuken, E.; Vink, C. & Bruggeman, C. A. (1998) One-step procedure for screening recombinant plasmid by size. *Biotechniques* **24**:748-750.
- Bhandari, P. & Gowrinshankar, J. (1997) An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *J Bacteriol.* **179**(13):4403-6
- Birnboim, H. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**(6):1513-1523.
- Bordet, J. & Gengou, O. (1906) Le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur* **20**:731-741.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**:248-254.
- Brennan, M.J. & Shahin, R.D. (1996) Pertussis antigen that abrogate bacterial adherence and elicit immunity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**:145-149.
- Brennan, M.J.; Burns, D.L.; Meade, B.D.; Shahin, R.D. & Manclark, C.R. (1992) Recent advantages in the development of pertussis vaccines. In R. Ellis (Ed.) Vaccines: new approaches to immunological problems. Butterworth, Shoreham, Mass 23-52

- Canthaboo, C.; Willians, L.; Xing, D.K.L. & Corbel, M.J. (2001) Investigation of cellular and humoral immune responses to whole cell and acellular pertussis vaccine. *Vaccine* **19**:637-643.
- Cherry, J.D; Brunell, P.A. & Golden G.S. (1988) Report of the Task Force on pertussis and pertussis imunizzation. *Pediatrics* **81**:939-984.
- Cody, C.L.; Larry, J.B.; Cherry, J.D.; Marcy, S.M.; Manclarck, C.R. (1981) Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children. *Pediatrics* **68**:1744-1749.
- Corbel, M.J.; Xing, D.K.L.; Bolgiano, B. & Hockley, D.J. (1999) Approaches to the control of acellular pertussis vaccines. *Biologicals* **27**:133-141.
- Darnell, J.; Lodish, H. & Baltimore, D. (1986) Molecular Cell Biology. Ed. Scientific American Books.
- Davis, H.L.; Michel, M.L. & Whalen, R.G. (1993) DNA based immunization for hepatitis B induces continuous secretion of antigen and high levels of circulating antibody. *Human Molec Genet.* **2**:1847-1851.
- Delisse-Gathoye, A.M.; Locht, C.; Jacob, F.; Raaschou-Nielsen, M.; Heron, I.; Ruelle, J.-L.; De Wilde, M. & Cabezon, T. (1990) Cloning, partial sequence, expression, and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **58**: 2895-2905.
- Dias, W.O.; Horton, D.S.P.Q.; Cainelli Gerbara, V.C.B.; Furuyama, N.; Risoleo, L.; Ferreira, V.R.F. & Raw, I. (2002) Vitamin A as adjuvant to the mouse immune reposnse to pertussis, tetanus and diphteria vaccines. *Biotechnol. Lett.* **24**:1515-1518.
- Di-Tommaso, A.; Domenighini, M.; Bugnoli, M.; Tagliabue, A.; Rappuoli, R. & De Magistris, M.T. (1991) Identification of subregions of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin that stimlate human T-cell responses. *Infect Immun.* **59**:3313-3315.
- Domenighini, M.; Relman, D.; Capiou, C.; Falkow, S.; Prugnola, A.; Scarlato, V. & Rappuoli, R. (1990) Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol. Microbiol.* **4**: 787-800.
- Dougan, G. (1994) The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens: implications for oral vaccine development. *Microbiology.* **140**:215-224.
- Edwards, K.M. (1993) Acellular pertussis vaccines - a solution to the pertussis problem? *J. Infect. Dis.* **168**: 15-20.

- El-Sheikh, A.; Liu, C.; Huang, H.; Edgington, T.S. (2002) A Novel Vascular Endothelial Growth Factor Heparin-binding Domain Substructure Binds to Glycosaminoglycans *in Vivo* and Localizes to Tumor Microvascular Endothelium. *Cancer Res.* **62**:7118-7123.
- Fine, P.E.M. & Clarkson, J.A. (1987) Reflections on the efficacy of pertussis vaccine. *Rev. Infect Dis.* **9**:866-883.
- Finlay, B.B. & Falkow, S. (1989) Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* **53**: 210-230.
- Friedman, R.L.; Nordensson, K.; Wilson, L.; Akporiaye, ET & Yocum, D.E. (1992) Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* **60**:4578-4585.
- FUNASA (2002) Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica 2002. Ministério da Saúde.
- FUNASA (2002) Vacina Tetravalente – Informe Técnico– Programa Nacional de Epidemiologia, Centro Nacional de Imunizações , Fundação nacional de saúde,ministério da saúde, Brasil
- Gerritse, K.; Posno, M.; Schellekens, M.M.; Boersma, W.J.A. & Claassen, E. (1990) Oral administration of TNP-*Lactobacillus* conjugates in mice: a model for evaluation of mucosal and systemic immune responses and memory formation elicited by transformed lactobacilli. *Res. Microbiol.* **141**:955-962.
- Golden, G.S. (1990) Pertussis vaccine and injury to the brain. *J. Pediatr.* **116**:854-861.
- Gonsalbes, M.J., Monedero, V. & Pérez-Martínez, G. (1999) Elements involved in catabolite repression and substrate induction of the lactose operon in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* **181**: 3928 – 3934.
- Gonsalbes, M.J.; Pérez-Arellano, I.; Esteban, C.D.; Galán, J.L. & Pérez-Martínez, G. (2001) Use of *lac* elements for gene expression in *Lactobacillus casei*. *Lait.* **81**:29-35.
- Gowrishankar, J. (1985) Identification of osmoresponsive genes in *Escherichia coli*: evidence for participation of potassium and proline transport systems in osmoregulation. *J. Bacteriol* **164**:434.
- Grangette, C.; Müller-Alouf, H.; Geoffroy, Goudercourt, D.; M.C.; Turneer, M. & Mercenier, A. (2002) Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and in vivo persistence. *Vaccine* **20**:3304-3309.
- Grangette, C.; Müller-Alouf, H.; Goudercourt, D.; Geoffroy, M.C.; Turneer, M. & Mercenier, A. (2001) Mucosal Immune response and protection against tetanus toxin after

- intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infection and Immunity* **69**:1547-1553.
- Greco, D.; Salmaso, S.; Mastrantonio, P.; Giuliano, M.; Tozzi, A.E.; Anemona, A.; Ciofi, D.A.M.; Giammanco, A.; Pani, P.; Blackwelder, W.C.; Klein, D.L. & Wassilak, S.G. (1996) A controlled trial of two acellular vaccine and one whole-cell vaccine against pertussis. *N. Engl. J. Med.* **334**:341-348.
- Gustafsson, L.; Hallander, H.O.; Olin, P.; Reizenstein, E. & Storsaeter, J. (1996) A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N. Engl. J. Med* **334**:349-355.
- Hannah, J.H.; Menozzi, F.D.; Renauld, G.; Loch, C. & Brennan, M.J. (1994) Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect. Immun.* **62**: 5010-5019.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988) Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Holck, A. & Naes, H. (1992) Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151. *J. Gen. Microbiol.* **138**:1353-1364.
- Holmes, W.H. (1940) Bacillary and rickettsial infections: acute and chronic, black death to white plague. In Whooping cough of pertussis. Ed. Holmes WH Mac Millan. New York: 395-414.
- Isolauri, E.; Joensuu, J.; Suomalainen, H.; Luomala, M. & Veskari, T. (1995) Improved immunogenicity of oral DxRRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* **13**:310-312.
- Jacob, F.; Capiou, C.; Gathoye, A.M.; Loch, C. & Cabezon, T. (1988) Molecular cloning of the filamentous hemagglutinin structural gene from *Bordetella pertussis* in *Escherichia coli*, p. 62-68. In S. Mebel. H. Stompe. M. Drescher, & S. Rustenbach (ed.), FEMS Symposium on Pertussis. Federation of European Microbiological Societies, Berlin.
- Jacob-Dubuisson, F.; Buisine, C.; Mielcarek, N. Clement, E.; Menozzi, F.D. & Loch, C. (1996) Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Mol. Microbiol.* **19**: 65-78.
- Jadhav, S.S. & Gairola, S. (1999) Composition of acellular pertussis and combination vaccines: a general review. *Biologicals* **27**:105-110.

- Junqueira-Azevedo, I.L.; Farsky, S.H.; Oliveira, M.L. & Ho, P.L. (2001) Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. *J Biol Chem.* **276**(43):39836-42.
- Kajava, A.V.; Cheng, N.; Cleaver, R.; Kessel, M.; Simon, M.N.; Willery, E.; Jacob-Dubuisson, F.; Locht, C. & Steven, A.C. (2001) Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Mol. Microbiol.* **42**:279-292.
- Kendrick, P.L. & Eldering, G. (1939) A study in active immunization against pertussis. *Am. J. Hyg.* **29**:133-153.
- Kendrick, P.L.; Eldering, G. & Dixon, M.K. (1947) Mouse protection tests in the study of pertussis vaccine: A comparative series using intracerebral route for challenge. *Am. J. Public Health* **37**:803-810.
- Kimura, A.; Mountzouros, K.T.; Relman, D.A.; Falkow, S. & Cowell, J.L. (1990) *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect. Immun.* **58**: 7-16.
- Kimura, M & Kuno-Sakai (1988) Pertussis vaccine in Japan. *Act. Pediatr. Jpn* **30**:143-153.
- Kimura, M & Kuno-Sakai (1990) Developments in pertussis immunization in Japan. *Lancet* **336**:30-32.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
- Lai, W.C. & Bennett, M. (1998) DNA vaccines. *Crit. Rev. Immunol.*, **18**: 449-484.
- Lambert, H.S. (1965) Epidemiology of a small pertussis outbreak in Kent County, Michigan. *Public Health Rep.* **80**:365-369.
- Lapin, J.H. (1943) Whooping Cough. Springfield, IL:Charles C Thomas.
- Leininger, E.; Bowen, S.; Renauld-Mongenie, G.; Rouse, J.H.; Menozzi, F.D.; Heron, I. & Brennan, M.J. (1997) Immunodominant domains present on the *Bordetella pertussis* vaccine component filamentous hemagglutinin. *J. Infect Dis.* **175**:1423-1431.
- Leininger, E.; Kenimer, J.G. & Brennan, M.J. (1990) Surface proteins of *Bordetella pertussis*: role in adherence, p. 100-104. In C. R. Manclark (ed.), Proceeding of the Sixth International Symposium on Pertussis. U.S. Public Health Service, Department of Health and Human Services, Bethesda, Md.

- Leininger, E.; Roberts, M.; Kenimer, J.G.; Fairweather, N.; Novotny, P. & Brennan, M.J. (1991) Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 345-349.
- Liu, D.-F.; Phillips, E.; Wizemann, T.M.; Siegel, M.M.; Tabei, K.; Cowell, J.L. & Tuomanen, E. (1997) Characterization of a recombinant fragment that contains a carbohydrate recognition domain of the filamentous hemagglutinin. *Infect. Immun.* **65**: 3465-3468.
- Locht, C. & Keith, J.M. (1986) Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science* **232**: 1258-1264.
- Locht, C.; Bertin, P.; Menozzi, F.D. & Renauld, G. (1993) The filamentous hemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol* **9**: 653-660.
- Locht, C.; Cieplak, W.; Marchitto, K.S.; Sato, H. & Keith, J.M. (1987) Activities of complete and truncated forms of pertussis toxin subunits S1 and S2 synthesized in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55**: 2546-2553.
- Long, S.; Welkon, C.J. & Clark, J.L. (1990) Widespread silent transmission of pertussis in families: antibodies correlates of infection and symptomatology. *J. Infect. Dis.* **161**:480-486.
- Lopez-Macias, C.; Lopez-Hernandez, M.A.; Gonzales, C.A.; Esibasi, A. & Ortiz-Navarrete (1996) V. Induction of antibodies against Salmonella typhi Omx C poria by naked DNA immunization. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **772**: 285-288.
- Lowrie, D.B.; Silva, C.L.; Colston, M.J.; Ragno, S. & Tascon, R.E. (1997) Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine*, **15(8)**: 834-838.
- Maassen, C.B.; Laman, J.D.; den Bak-Glashouwer, M.J.; Tielen, F.J.; van Holten-Neelen, J.C.; Hoogteijling, L.; Antonissen, C.; Leer, R.J.; Pouwels, P.H.; Boersma, W.J. & Shaw, D.M. (1999) Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine* **17**:2117-2128.
- Maassen, C.B.; van Holten-Neelen, J.C.; Balk, F.; Heijne den Bak- Glashouwer, M.J.; Leer, R.; Laman, J.D.; Boersma, W.J. & Claassen, E. (1998) Orally administered *Lactobacillus* strain differentially affect the direction and efficacy of the immune response. *Vet. Q.* **20(3)**:81-83.
- Madsen, T. (1933) Vaccination against whooping cough. *JAMA* **101**:187-188.
- Makhov, A.M.; Hannah, J.H.; Brennan, M.J.; Trus, B.; Kocsis, E.; Conway, J.F.; Wingfield, P.T.; Simon, M.N. & Steven, A.C. (1994) Filamentous hemagglutinin of *Bordetella*

- pertussis*. A bacterial adhesin formed as 50 nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J. Mol. Biol.* **241**: 110-124.
- Meade, B.D.; Kind, P.D.; Ewell, J.B.; McGrath, P.P. & Manclark, C.R. (1984) In vitro inhibition of murine macrophage migration by *Bordetella pertussis* lymphocytosis-promoting factor. *Infect Immun.* **45**(3):718-725.
- Medical Research Council (1956) Vaccination against whooping cough *Br. Ed. J.* **1**:994-1000.
- Medical Research Council (1959) Vaccination against whooping cough: Relation between protection in children and results of laboratory tests. *Br. Ed. J.* **2**:454-462.
- Menzio, F.D.; Mutombo, R.; Renauld, G.; Gantiez, C.; Hannah, J.H.; Leininger, E.; Brennan, M.J. & Loch, C. (1994) Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **62**: 769-778.
- Mestecky, J. (1987) The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol.* **7**:265-276.
- Mills, K.H.G.; Ryan, M.; Ryan, E. & Mahon, B.P. (1998) A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **66**:594-602
- Nicosia, A.; Bartoloni, A.; Perugini, M. & Rappuoli, R. (1987) Expression and immunological properties of the five subunits of pertussis toxin. *Infect. Immun.* **55**: 963-967.
- Nicosia, A.; Perugini, M. Franzini, C.; Casagli, M.C. Borri, M.G.; Antoni, G.; Almoni, M.; Neri, P.; Ratti, G. & Rappuoli, R. (1986) Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and genetic duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4631-4635.
- Noble, G.R.; Bernier, R.H.; Esber, E.C.; Hardegree, M.C.; Hinman, A.R.; Klein, D. & Saah, A.J. (1987) Acellular and whole cell pertussis vaccine in Japan: report of a visit by USA scientists. *JAMA* **257**:1351-1356.
- Oliveira, M.L.S.; Monedero, V.; Miyaji, E.N.; Leite, L.C.C.; Ho, P.L. & Pérez-Martínez, G. (submitted) Expression of *Streptococcus pneumoniae* antigens, PsaA (Pneumococcal Surface Antigen A) and PspA (Pneumococcal Surface Protein A) by *Lactobacillus casei*.
- Perdigon, G., Vintini, E.; Alvarez, S.; Medina, M. & Medici, M. (1999) Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **82**(6):1108-1114.

- Perdigon, G.; Alvarez, S.; Rachid, M.; Agüero, G. & Gobbato, N. (1995) Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.* **78**(7):1597-1606.
- Piatti, G. (1999) Identification of immunodominant epitopes in the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* **23**:235-241.
- Powels, P.H.; Leer, R.J. & Boersma, W.J. (1996) The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *J. Biotechnol.* **44**(1-3):183-192.
- Prasad, S.M.; Yin, Y.; Rodzinsk, E.; Tuomanen, E.I. & Masure, H.R. (1993) Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **61**: 2780-2785.
- Ramos, C.R.R.; Figueiredo, R.C.R.; Pêwrtinhez, T.A.; Nascimento, A.L.T.O.; Tendler, M.; Raw, I.; Spisini, A. & Ho, P.L (2003) Gene structure and M20T polymorphism of the *Shistosoma mansoni* Sm14 fatty acid-binding protein. *J. Biol Chem.* In press
- Rappuoli, R.; Podda, A.; Pizza, M.; Covacci, A.; Bartoloni, A.; de Magistris, M.T. & Nencioni, L. (1992) Progress towards the development of new vaccines against whooping cough. *Vaccine* **10**: 1027-1032.
- Redd, S.C.; Rumschlag, S.; Biellik, R.J.; Sanden, G.N.; Reimer, C.B. & Cohen, M.L. (1988) Immunoblot analyses of humoral following infection with *Bordetella pertussis* or immunization with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. *J. Clin. Microbiol.* **26**:1373-1377.
- Relman, D.A.; Domenighini, M.; Tuomanen, E.; Rappuoli, R. & Falkow, S. (1989) Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2637-2641.
- Relman, D.A.; Tuomanen, E.; Falkow, S. Golenbock, D.T.; Saukkonen, K. & Wright, S.D. (1990) Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2. CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* **61**: 1375-1382.
- Renauld-Mongenie, G.; Cornette, J.; Mielcarek, N.; Menozzi, F.D. & Loch, C. (1996) Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Bacteriol* **178**: 1053-1060.
- Reveneau, N.; Geoffroy, M.C.; Loch, C.; Ghagnaoud, P. & Mercenier, A. (2002) Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine* **20**:1769-1777.

- Robinson, A. & Ashworth, L.A.E. (1988) Acellular and defined-component vaccines against pertussis. p.399-417. *In* A. C. Wardlaw and R. Parton (ed.), Pathogenesis and immunity in pertussis. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Robinson, A.; Irons, L.I.; Seabrook, R.N.; Pearce, A.; Matheson, M. & Funnell, S.G. P. (1990) Structure-function studies of *Bordetella pertussis* fimbriae, p. 126-135. *In* C. R. Manclark (ed.), Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis. DHHS Publication no. (FDA)90-1164. Department of Health and Human Services, Bethesda, Md.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning- A Laboratory Manual. 1,2 e 3 Vols., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sandros, J. & Tuomanen, E. (1993) Attachment factors of *Bordetella pertussis*: mimicry of eukaryotic cell recognition molecules. *Trends Microbiol.* **1**: 192-196.
- Sato, Y. & Sato, H. (1988) Further characterization of Japanese acellular pertussis vaccine prepared in 1988 by six Japanese manufactures. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **13**:79-88.
- Sato, Y.; Kimura, M. & Fukumi, H. (1984) Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* **i**: 122-126.
- Sato, Y.; Sato, H.; Tiru, M. Brown, F. (1991) Developments in Biological Standardization Vol. 73 Basel:Karger.
- Saukkonen, K.; Cabellos, C.; Burroughs, M.; Prasad, S. & Tuomanen, E. (1991) Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J. Exp. Med.* **173**: 1143-1149.
- Slos, P.; Dutot, P.; Reymund, J.; Kleinpeter, P.; Prozzi, D.; Kieny, M.P.; Delcour, J.; Mercenier, A. & Hols, P. (1998) Production of cholera toxin B subunit in *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **169(1)**:29-36.
- Stleider, L.; Robinson, K.; Chamberlain, L.; Schofield, K.M.; Remaut, E.; Le Page, R.W. & Wells, J.M. (1998) Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect. Immun.* **66(7)**: 3183-3189.
- Studier, F.W.; Rosenberg, A.H.; Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**: 60-89.
- Sun, Y; Hegamyer, G. & Colburn, N.H. (1993) PCR-direct sequencing of GC-rich region by inclusion of 10% DMSO: application mouse c-jun. *Biotechniques* **15**: 372-374.
- Tang, D.; DeVit, M. & Johnston, S.A. (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, **356**: 152-154.

- Thomas, M.G.; Ashworth, L.A.E.; Miller, E. & Lambert, H.P. (1990) Nasal immunoglobulin A responses to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin and agglutinogens 2 and 3 after infection with *Bordetella pertussis* and immunization with whole-cell pertussis vaccine. In C. R. Manclark (ed.) Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis, Department of Health and Human Services publication **90**:1194.
- Towbin, H.; Sthaehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4354.
- Tuomanen, E. & Weiss, A.A. (1985) Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **152**: 118-125.
- Tuomanen, E.; Towbin, H.; Rosenfelder, G.; Braun, D.; Hansson, G.; Larson, G. & Hill, R. (1988) Receptor analogs and monoclonal antibodies which inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells. *J. Exp. Med.* **168**: 267-277.
- Ui, M. (1998) The multiple biological activities of pertussis toxin. In Pathogenesis and immunity in pertussis. Ed. Wardlaw A.C. & Parton R. Wiley, New York.
- Ulmer, J.B.; Donnelly, J.J.; Parker, S.E.; Rhodes, G.H.; Felgner, P.L.; Dwarki, V.J.; Gromkowski, S.H.; Deck, R.R.; DeWitt, C.M.; Friedman, A.; Hawe, L.A.; Leander, K.R.; Martinez, D.; Perry, H.C.; Shiver, J.W.; Montgomery, D.L. & Liu, M.A. (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, **269**: 1745-1749.
- Walker, A.M.; Jick, H.; Perera, D.R.; Knauss, T.A. & Thompson, R.S. (1988) Neurologic events following diphtheria-tetanus-pertussis immunization. *Pediatrics* **81**:345-349.
- Watanabe, M.; Komatsu, E.; Sato, T. & Nagai, M. (2002) Evaluation of efficacy in terms of antibody levels and cell-mediated immunity of acellular pertussis vaccines in a murine model of respiratory infection. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* **33**:219-225.
- Weiss, A.A. & Falkow, S. (1984) Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **43**: 263-269.
- Weiss, A.A. & Hewlett, E.L. (1986) Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**: 661-686.
- Wilson, D.R.; Siebers, A.; & Finlay, B.B. (1998) Antigenic analysis of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with phage display libraries and rabbit anti-filamentous hemagglutinin polyclonal antibodies. *Infect. Immun* **66**: 4884-4894.
- World Health Organization (1999) Pertussis vaccines. Weekly Epidemiol. Record, WHO, Geneva. **74**:137-144.

- World Health Organization, Expert Committee on Biological Standardisation. (1964) Requirements for pertussis vaccine. In Requirements for Biological Substances **8**, 16th Report, WHO, Geneva.
- Xing, D.K.L.; Das, R.G.; Williams, L.; Canthaboo, C.; Tremmil, J. & Corbel, M.J. (1999) An aerosol challenge model of *Bordetella pertussis* infection as a potential bioassay for acellular pertusssis vaccines. *Vaccine* **17**:565-576.
- Zegers, N.D.; Kluter, E.; van Der Stap, H.; van Dura, E.; van Dalen, P.; Shaw, M. & Baillie, L. (1999) Expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* by *Lactobacillus casei*: towards the development of na oral vaccine against anthrax. *J. Appl. Microbiol.* **87**(2):309-314.