ALEX ISSAMU KANNO

Expressão de antígenos de
Schistosoma mansoni **em**
BCG recombinante

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2013

ALEX ISSAMU KANNO

Expressão de antígenos de
Schistosoma mansoni **em**
BCG recombinante

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Luciana Cezar de Cerqueira Leite

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Kanno, Alex Issamu.

Expressão de antígenos de *Schistosoma mansoni* em BCG
recombinante / Alex Issamu Kanno. – São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Vacinas recombinantes.

Versão do título para o inglês: Expression of *Schistosoma mansoni*
antigens in recombinant BCG.

1. BCG recombinante 2. *Schistosoma mansoni* 3. Resposta imune
4. *Mycobacterium smegmatis* 5. Promotor 6. Vacina I. Leite, Profa.
Dra. Luciana Cezar de Cerqueira II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0113/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Alex Issamu Kanno.

Título da Tese: Expressão de antígenos de *Schistosoma mansoni* em BCG recombinante.

Orientador(a): Profa. Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

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

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

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

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

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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telephone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão de antígenos de tegumento de *Schistosoma mansoni* em BCG recombinante: avaliação da resposta imune e proteção" **protocolo nº 594/09**, sob a responsabilidade de Luciana C. C. Leite e Alex Issamu Kanno, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **11/02/2010**.

We certify that the research entitled "Expression of antigens from *Schistosoma mansoni* tegument in recombinant BCG: immune response and protection evaluation", **protocol nº 594/09**, under the responsibility of Luciana C. C. Leite and Alex Issamu Kanno, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 02/11/2010

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
02/2010 - 08/2012 Centro de Biotecnologia	500/ camundongos C57BL/6 (Fêmeas) 228/camundongos Balb/C (Fêmeas) 10/ratos Wistar (Fêmeas) 100/hamster (Fêmeas)

São Paulo, 12 de fevereiro de 2010.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

À família.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Reonaldo e Ceiko cujo exemplo sempre serviram de inspiração para seguir adiante.

Ao meu irmão baka Binho e minha “irmã” Bruna que sempre me acompanham.

Aos meus avós Fumio e Hatsue. Aos meus avós Yoskito (*in memorian*) e a Natsuko (Obachan) (*in memorian*) cuja luz será eterno guia pelos caminhos e escolhas que hei de tomar.

Aos tios e tias e primos e primas e, enfim, à família, morada de minha paz e base de toda minha força.

Aos professores da graduação que me enriqueceram academicamente e, em especial, à profa. Patrícia Brites que me motivou ao caminho que percorri.

À Dra. Luciana Leite por ter aceito minha orientação e contribuído à minha formação acadêmica.

Ao Dr. Ivan Nascimento pela amizade, conselhos e risadas próprias de um Boka Preta!

À Dra. Dúnia Rodriguez pela ajuda irrestrita e fiel amizade. Aprendi muito nas *nuestras lecciones!*

Aos Drs e Dras, doutorandos e doutorandas fiéis à luta no lab Léo Farias, Ci Tararam, Bogar, Mi Darrieux, Viníciux, Fer Cabral, Henrique Dirty, Rafa, Larissa, Tiagão e Cibelly e em sua luta tornaram a minha viagem mais agradável.

Às funcionárias do laboratório e do Centro de Biotecnologia Darlene, Marlene, Dona Vera (*in memoriam*), Solange, Fafá, Marisinha, Teresa e André.

Aos amigos e colegas que através do Instituto Butantan tive o prazer de conhecer Dri Moreno, Lu Schons, Ju Branco, Ágatha, Léo Kobashi, Lu Fentanes e Larica e que cedo ou tarde conheceram este transeunte aleatório em suas vidas.

Aos eternos amigos de Cachoeira do Sul Tobias, Rafael, Gabriel, Joãozinho, Marcelo, Pedro, Alexandre, André, Guiga, Roger, Fabrízio e Diego cujas histórias são eternas!

À Tatita cuja presença alegria meus dias.

Ao Dr. Johnjoe McFadden e Dra. Dany Beste pela ajuda e por me receber em Guildford.

Aos amigos de Guildford Dani, Liisi, Miks, Cristiano, Emily, Gio, Mateus, Rick, Cindy, Zack, Klaus, Olivia e Mike por terem tornado fantástica a minha temporada em G!

Ao Solar dos Príncipes, lugar de repouso, reflexão (tá bom..) e alegria. À família Solar: Erechim, Baianinho, Bono Vox, Curió, Cando, Dirty e Pinto; Nóia, Pelotinhas, Bri, Fiuk, Peixe, DeCecco (Mutanda), Negão, Gusteau, George, Monstro e Menck.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Doutorado Direto – Processo 2008/04631-7).

“Eu não sei como eu posso parecer ao mundo, mas para mim, pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me ao encontrar aqui e ali um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece desconhecido à minha frente.”

— **Sir Isaac Newton**

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

— **Marthin Luther King**

“Na minha opinião, tudo que é necessário para a fé é a crença de que, ao fazer o nosso melhor vamos chegar mais perto do sucesso em nossos objetivos: a melhoria do destino da humanidade, presente e futuro.”

— **Rosalind Elsie Franklin**

“[...]exatamente nesse instante caiu um cisco de antimatéria no meu olho e tive de arranjar um cotonete para removê-lo. Eu tinha perdido quase toda a esperança, quando ela se virou para mim e falou:- Desculpe. Eu ia pedir um café e um bolinho, mas agora parece que não consigo me lembrar da equação de Schrödinger [...].- Evolução das ondas de probabilidade - falei. - E se você vai fazer um pedido ao garçom, eu gostaria muito de um bolinho inglês com múons e chá.” in Fora de Órbita

— **Woody Allen**

RESUMO

KANNO, A. I. **Expressão de antígenos de *Schistosoma mansoni* em BCG recombinante.** 2013. 135 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O BCG é um bacilo atenuado de *Mycobacterium bovis*, atualmente utilizado como vacina profilática contra a tuberculose. Por suas propriedades adjuvantes o BCG tem sido investigado na expressão de antígenos heterólogos como vacina multivalente. Genes de antígenos importantes oriundos de vírus, bactérias e parasitas são clonados em vetores micobacterianos e a partir deles, são geradas cepas de BCG recombinante (rBCG). No presente trabalho, foram construídos vetores de expressão micobacterianos para direcionar a expressão dos genes de *Schistosoma mansoni*: *smtsp-2*, *sm29*, *smval-4*, *smval-5* e *smstolp-2*, em duas espécies de micobactérias, BCG e *M. smegmatis* e observamos expressão do antígeno SmStoLP-2. Animais imunizados com as construções de rBCG expressando SmStoLP-2 revelaram uma resposta imune diferenciada, embora não tenha sido observado uma diferença de proteção contra a infecção por cercárias. Outra estratégia foi tentar obter a expressão destes genes a partir de seus códons otimizados (*smtsp-2opt*, *sm29opt* e *smval-5opt*) que possibilitaram detectar a expressão dos antígenos SmTSP-2 e SmVAL-5 apenas em *M. smegmatis*. Ainda, com o objetivo de expressar os antígenos de *S. mansoni* em BCG, em uma linha de trabalho complementar, construímos uma biblioteca de plasmídeos contendo um promotor de micobacteriófago mutagenizado randomicamente, na qual foi possível verificar a diferença na força dos promotores mutados usando a proteína fluorescente verde como “reporter” (eGFP). *M. smegmatis* foi usada como ferramenta de primeira escolha para análise da força desses promotores onde encontramos uma grande diferença de fluorescência entre os bacilos analisados. Dois destes plasmídeos – definidos como “forte” e “fraco”, com base em sua capacidade de produzir eGFP – foram utilizados para direcionar em BCG, a expressão dos antígenos inicialmente propostos e conseguimos observar a expressão de Sm29, induzida em níveis diferentes por cada promotor. O rBCG expressando maiores quantidades de Sm29 foi capaz de induzir uma resposta imune específica em camundongos imunizados.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis* BCG. *M. smegmatis*. *Schistosoma mansoni*. BCG recombinante. Vacina. Promotor. eGFP.

ABSTRACT

KANNO, A. I. **Expression of *Schistosoma mansoni* antigens in recombinant BCG.** 2013.135 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

BCG is an attenuated bacillus derived from *Mycobacterium bovis* currently used as prophylactic vaccine to tuberculosis. Its adjuvant properties led BCG to be also investigated as a vector in the expression of foreign antigens as a multivalent vaccine. Genes from viruses, bacteria and parasites antigens are cloned to mycobacterial vectors and with them, recombinant BCG strains (rBCG) are created. In this work, mycobacterial expression vectors were constructed to express *Schistosoma mansoni* genes: *smtsp-2*, *sm29*, *smval-4*, *smval-5* and *smstolp-2* in two species, BCG and *M. smegmatis* and we observe the expression of SmStoLP-2. Mice immunized with these rBCG constructs expressing SmStoLP-2 show a different immune response despite no protection against cercarial challenge could be observed. Another strategy was using codon optimized genes (*smtsp-2opt*, *sm29opt* e *smval-5opt*) which allowed the expression of SmTSP-2 e SmVAL-5 only in *M. smegmatis*. Thereafter, pursuing the expression of *S. mansoni* antigens in BCG, in a complementary line of work, a library of plasmids containing a mycobacteriophage promoter sequence altered by random mutagenesis was created using the green fluorescent protein as reporter (eGFP). *M. smegmatis* was used as a primary tool to analyze the strength of these promoters as they showed a wide range in fluorescence between screened transformants. Two of these plasmids – a strong and a weak – defined as such to their ability in producing eGFP were used to express in BCG the proposed *S. mansoni* antigens and we observe the expression of Sm29 at different levels by each promoter. The rBCG strain expressing high levels of Sm29 induced a specific immune response in immunized mice.

Keywords: *Mycobacterium bovis* BCG. *M. smegmatis*. *Schistosoma mansoni*. Recombinant BCG. Vaccine. Promoter. eGFP.

LISTA DE ABREVIATURAS

μF, micro Faradays

8-oxo-dGTP, 8-Oxo-2'-deoxy-guanosine-5'-triphosphate

ATCC, do inglês “American Type Culture Collection”

BCG, Bacilo de Calmette e Guérin

CD, do inglês “cluster of differentiation”

CDS, do inglês “coding sequence” – Sequência codificante

CFU, do inglês “colony forming unit” – Unidades formadoras de colônia

dNTP, deoxirubonucleotídeo trifosfato

dPTP, 6H-8H-3,4-dihydro-pyrimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-1-8-β-D-2'-deoxy-ribofuranosid-5'-triphosphate

DU, do inglês “tandem duplication” – Região de duplicação em tandem

eGFP, do inglês “enhanced green fluorescent protein”

ELISA, do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”

ELISPOT, do inglês “enzyme-linked immunosorbent spot”

F.U., do inglês “fluorescence unit” – Unidade de fluorescência

FITC, do inglês “fluorescein isothiocyanate”

FSC, do inglês “forward scatter channel”

GM-CSF, do inglês “Granulocyte macrophage colony-stimulating factor”

GMP, do inglês “good manufacturing practices”

IFN-γ, Interferon-gama

IgG, Imunoglobulina G

IL, Interleucina

kV, kilovolts

LB, do inglês “lysogeny broth”

MB7H9, meio de cultura Middlebrook 7H9 glicerol 0,5% e Tween 80 0,05%

MB7H0, meio de cultura Middlebrook 7H10 glicerol 0,5%

Mega SD, sequência Shine-Dalgarno de micobactéria

MHC, do inglês “Major Histocompatibility complex” – Complexo Principal de Histocompatibilidade

NK, do inglês “Natural killer”

NTD, do inglês “Neglected Tropical Disease” – Doença tropical negligenciada

OADC, suplemento do meio Middlebrook (ácido oleico-albumina-dextrose-catalase)

OMS, Organização Mundial de Saúde

ORF, do inglês “Open Reading Frame” – Quadro de leitura aberto

oriE, origem de replicação em *E. coli*

oriM, origem de replicação em micobactéria

OXA, Oxamniquina

PBS, solução salina tamponada

PCR, do inglês “Polymerase chain reaction” – Reação em cadeia da polimerase

PIC, do inglês “protein inhibitor cocktail” – Coquetel de inibidor de proteases

PPD, do inglês “Purified protein derivative”

PZQ, Praziquantel

R.F.U., do inglês “relative fluorescence units” – Fluorescência relativa

rBCG, BCG recombinante

RBS, do inglês “Ribosome binding site” – Sítio de ligação ribossomal

RD, do inglês “region of difference” – Região de diferença

RPM, rotações por minuto

sDLN, do inglês “skin-draining lymphnode” – Linfonodos drenantes da pele

SDS-PAGE, do inglês “sodium dodecyl-sulfate polyacrilamide gel electrophoresis”

SFB, soro fetal bovino

SmVALs, do inglês “Venom-allergen like proteins” de *S. mansoni*

SSC, do inglês “side scatter channel”

TAE, solução de tris-ácido acético-EDTA

Th1 e Th2, do inglês “T helper” 1 e 2 – Resposta auxiliar do tipo 1 e 2

Tn903, transposon de resistência à canamicina

TNF- α , do inglês “Tumor necrosis factor alfa” – Fator de necrose tumoral alfa

WISH, do inglês “Whole-amount *in situ* hybridization”

Ω , ohms

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Filogenia genética das subcepas de BCG	24
Figura 2 – Pulmão de camundongos infectados com BCG	26
Figura 3 – Distribuição e co-incidência geográfica das doenças negligenciadas mais prevalentes.....	35
Figura 4 – Distribuição da esquistossomose no Brasil	37
Figura 5 – Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	39
Figura 6 – Migração dos parasitas no modelo murino	40
Figura 7 – Interação dos parasitas atenuados por radiação com o sistema imunológico no modelo murino	41
Figura 8 – Representação do tegumento de <i>S. mansoni</i>	45
Figura 9 – Representação da tetraspanina-D na superfície do <i>S. mansoni</i>	49
Figura 10 – Representação esquemática dos vetores de expressão utilizados	57
Figura 11 – Representação esquemática do ensaio de avaliação da proteção induzida pelo rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto	62
Figura 12 – Representação esquemática do ensaio de avaliação da resposta imune induzida pelo rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto	63
Figura 13 – Representação esquemática do ensaio de avaliação da resposta imune induzida pelo rBCG-Sm29	64
Figura 14 – Desenho esquemático do plasmídeo pJH-gfp	67
Figura 15 – Representação da abordagem experimental para a geração e caracterização de <i>M. smegmatis</i> ::pJK	68
Figura 16 – Western blot de rSmeg::pMIPSto e rSmeg::pLA71Sto.	74
Figura 17 – Western blot de rBCG::pLA71Sto, rBCG::pLA73Sto e rBCG::pMIPSto ..	75
Figura 18 – Localização de SmStoLP-2 em rBCG::pLA71Sto e rBCG::pMIPSto.....	76
Figura 19 – Anticorpos IgG anti-SmStoLP-2 induzidos por rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto.....	77

Figura 20 – ELISPOT para IFN-γ dos esplenócitos de animais imunizados com rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto.	78
Figura 21 – ELISPOT para IL-4 dos esplenócitos de animais imunizados com rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto	78
Figura 22 – Desafio dos animais imunizados com rBCG expressando SmStoLP-2	79
Figura 23 – Oviposição no fígado dos camundongos imunizadas com rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto	80
Figura 24 – Western blot de rSmeg::pMIPVAL-5opt	81
Figura 25 – Western blot de rSmeg::pLA71VAL-5opt	82
Figura 26 – Western blot de rBCG::pMIPVAL-5opt e rBCG::pLA71VAL-5opt	83
Figura 27 – Western blot de rSmeg::pMIPTSP-2opt	84
Figura 28 – Western blot de rSmeg::pLA71TSP-2opt	84
Figura 29 – Western blot de rBCG::pMIPTSP-2opt	85
Figura 30 – Western blot de rSmeg::pMIPSm29opt	86
Figura 31 – Western blot de rSmeg::pLA71Sm29opt	86
Figura 32 – Western blot de rBCG::pMIPSm29opt	87
Figura 33 – Fluorescência e densidade ótica de <i>M. smegmatis</i>::pJH-gfp	88
Figura 34 – Correlação entre fluorescência e densidade ótica dos transformantes <i>M. smegmatis</i>::pJK	89
Figura 35 – Fluorescência relativa de <i>M. smegmatis</i>::pJK	90
Figura 36 – Sequência nucleotídica dos promotores mutagenizados	91
Figura 37 – Fluorescência de <i>M. smegmatis</i>::pJK por citometria de fluxo	92
Figura 38 – Intensidade da fluorescência de <i>M. smegmatis</i>::pJK	93
Figura 39 – A fluorescência de <i>M. smegmatis</i>::pJK se mantém constante ao longo do crescimento	94
Figura 40 – Curva de crescimento de <i>M. smegmatis</i>::pJK	95
Figura 41 – Crescimento e fluorescência de <i>M. smegmatis</i>::pJK-D6 em cultivo	96

Figura 42 – Microscopia de fluorescência confocal (FLUOR) do cultivo de <i>M. smegmatis</i>::pJK-D6.....	97
Figura 43 – Fluorescência de BCG::pJK	97
Figura 44 – Fluorescência de BCG::pJK analisada por citometria de fluxo	98
Figura 45 – Fluorescência induzida pelos vetores pJK em <i>M. smegmatis</i> e BCG	98
Figura 47 – Western blot de rBCG::pJK-C1.Sm29opt, rBCG::pJK-B7.Sm29opt e rBCG::pJK-A2.Sm29opt	100
Figura 48 – Anticorpos IgG anti-Sm29 induzidos por rBCG-Sm29.....	101
Figura 49 – Produção de IFN-γ, TNF-α e IL-10 pela imunização com rBCG-Sm29	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Primeira geração de vetores para recombinação em micobactéria.....	28
Quadro 2 – Descrição dos fragmentos genéticos presentes em vetores micobacterianos frequentemente usados.....	29
Quadro 3 – Prevalência, mortalidade e as medidas de controle epidemiológico adotadas para as principais NTDs	36
Quadro 4 – Características dos antígenos testados pelo O.M.S. em 1996	43
Quadro 5 – Características dos antígenos de <i>S. mansoni</i> utilizados no projeto.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	A vacina BCG	22
1.2	Características da vacina BCG	24
1.3	O BCG recombinante	27
1.3.1	<i>Vetores de expressão micobacterianos</i>	27
1.3.2	<i>Promotores micobacterianos</i>	30
1.3.3	<i>Expressão de citocinas em BCG recombinante</i>	31
1.3.4	<i>Expressão de citolisinas em BCG recombinante</i>	31
1.3.5	<i>Expressão dos fragmentos RD perdidos na atenuação do BCG</i>	32
1.3.6	<i>Expressão de antígenos heterólogos</i>	33
1.4	Doenças tropicais negligenciadas	34
1.5	A esquistossomose e o parasita <i>Schistosoma mansoni</i>	36
1.5.1	<i>Controle epidemiológico da esquistossomose</i>	37
1.5.2	<i>Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i></i>	38
1.5.3	<i>Desenvolvimento de vacinas: O modelo de proteção de cercárias irradiadas</i>	39
1.5.4	<i>Vacinas para esquistossomose</i>	42
1.6	Vacina para esquistossomose baseada em BCG recombinante	43
1.7	Antígenos de <i>S. mansoni</i> identificados no transcriptoma	45
1.7.1	<i>Sm29</i>	46
1.7.2	<i>SmVAL-4</i>	47
1.7.3	<i>SmVAL-5</i>	47
1.7.4	<i>SmTSP-2</i>	48
1.7.5	<i>SmStoLP-2</i>	49
2	OBJETIVOS	50
2.1	Objetivo geral	50
2.2	Objetivos específicos	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	Cepas bacterianas e condições de crescimento	51
3.2	Preparação de bactérias competentes e transformação	51
3.2.1	<i>E. coli DH5α quimiocompetente</i>	51
3.2.2	<i>M. smegmatis MC² 155 eletrocompetente</i>	52
3.2.3	<i>M. bovis BCG eletrocompetente</i>	53

3.3	Obtenção dos fragmentos gênicos	53
3.4	Construção dos vetores de expressão	54
3.4.1	<i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	54
3.4.2	<i>Digestão e ligação</i>	55
3.4.3	<i>Recuperação plasmidial</i>	55
3.4.4	<i>Otimização de códons</i>	57
3.5	Animais	58
3.6	Produção dos anticorpos	59
3.7	Geração de <i>M. smegmatis</i> e BCG recombinante	59
3.7.1	<i>Análise da expressão por Western blot</i>	59
3.7.2	<i>Preparo das vacinas</i>	61
3.8	Avaliação da proteção pela redução da carga parasitária	61
3.8.1	<i>Contagem de ovos</i>	62
3.9	Avaliação da resposta imune	63
3.9.1	<i>Determinação de anticorpos IgG por ELISA</i>	63
3.9.2	<i>Determinação de citocinas por CBA</i>	65
3.9.3	<i>Determinação de células produtoras de citocinas por ELISPOT</i>	65
3.10	Criação da biblioteca de plasmídeos pJK	66
3.10.1	<i>Geração de pJH-gfp</i>	66
3.10.2	<i>Mutagênese randômica por PCR</i>	68
3.10.3	<i>Screening de <i>M. smegmatis</i>::pJK</i>	70
3.10.4	<i>Caracterização de <i>M. smegmatis</i>::pJK</i>	70
3.10.5	<i>Citometria de fluxo e microscopia confocal</i>	70
3.11	Adaptabilidade dos plasmídeos pJK	71
4	RESULTADOS	73
4.1	Construção dos vetores de expressão usando genes nativos e análise da expressão em <i>M. smegmatis</i> e BCG recombinante	73
4.1.1	<i>Expressão de SmStoLP-2 em <i>M. smegmatis</i> e BCG</i>	73
4.1.2	<i>Localização de SmStoLP-2 em rBCG::pLA71Sto e rBCG::pMIPSto</i>	75
4.1.3	<i>Resposta imune induzida por rBCG::pLA71Sto e rBCG::pMIPSto</i>	76
4.1.4	<i>Ensaio de desafio e proteção</i>	79
4.2.	Construção dos vetores de expressão usando genes com códons otimizados e análise da expressão em <i>M. smegmatis</i> e BCG recombinante	80
4.2.1	<i>Expressão de SmVAL-5 em <i>M. smegmatis</i></i>	81

4.2.2	Expressão de SmTSP-2 em <i>M. smegmatis</i>	83
4.2.3	Expressão de Sm29	85
4.3	Geração de promotores mutagenizados por “error-prone” PCR	87
4.3.1	Crescimento e fluorescência de <i>M. smegmatis</i> ::pJH-gfp	88
4.3.2	Screening de <i>M. smegmatis</i> ::pJK	88
4.3.3	Sequência nucleotídica dos promotores mutagenizados	90
4.3.4	Caracterização de <i>M. smegmatis</i> ::pJK	92
4.3.5	Caracterização de BCG::pJK.....	97
4.4	Construção dos vetores de expressão usando promotores mutagenizados e análise da expressão em BCG recombinante	99
4.4.1	Expressão de Sm29 em BCG recombinante	99
4.4.2	Resposta imune induzida por rBCG-Sm29	100
5	DISCUSSÃO	103
5.1	Expressão dos candidatos vacinais em BCG usando genes nativos.....	103
5.2	Expressão dos candidatos vacinais em BCG usando genes otimizados	104
5.3	Geração de promotores mutagenizados por “error-prone” PCR	106
5.4	Expressão dos candidatos vacinais pelos promotores mutagenizados	108
5.5	Imunogenicidade de rBCG-Sm29	108
6	CONCLUSÃO	111
	REFERÊNCIAS	113
	APÊNDICE A – Sequência nucleotídica dos fragmentos amplificados, características e oligonucleotídeos diretos e reversos utilizados.....	126
	APÊNDICE B – Análise da requisição de códons dos fragmentos de <i>S. mansoni</i> e a disponibilidade dos respectivos tRNAs em <i>M. bovis</i> BCG Pasteur 1173P2.....	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 A vacina BCG

O desenvolvimento da vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guérin) data do início do século XX, quando uma cepa de *Mycobacterium bovis*, foi isolada por Edmond Nocard a partir do leite de uma vaca com tuberculose em 1902, e posteriormente repassada aos pesquisadores do Instituto Pasteur na França, Albert Calmette e Camille Guérin. A princípio, os estudos focavam-se na patologia causada por *M. bovis* e a necessidade de desfazer os grumos bacilares característicos de cultivos desta cepa e obter emulsões homogêneas do bacilo fizeram com que testassem alguns métodos diferentes, onde o mais eficiente foi a adição de bile bovina ao meio de cultura. Este meio de batata glicerizada contendo bile bovina foi então padronizado para o cultivo de *M. bovis* (CALMETTE, 1931).

A grande descoberta, e que mudou o foco dos estudos, ocorreu após 30 passagens neste meio contendo bile quando a cepa torna-se incapaz de matar cobaias. Após 60 passagens a cepa ainda detinha certa virulência em coelhos e cavalos, mas demonstra ser totalmente avirulenta em cobaias, macacos e bezerros (BEHR, 2002).

O fato desta nova cepa ser menos virulenta significava que a atenuação do bacilo era possível e conseqüentemente a possibilidade de se obter proteção cruzada contra a tuberculose humana, causada principalmente pelo *M. tuberculosis*. Os subcultivos deste “bile-bacilo” seguiram-se por mais de uma década – inclusive demonstrando-se proteção contra o desenvolvimento de tuberculose em modelos animais – até que em 1º de julho de 1921 surge a 1ª oportunidade de teste em um ser humano – no momento em que a cepa encontrava-se na 230ª passagem. O caso de um neonato, cuja mãe tuberculosa havia falecido logo após o parto e a avó também tuberculosa, foi vacinado via oral com 6 mg de bile-bacilo divididos em 3 doses, vindo a desenvolver-se normalmente sem qualquer tipo de reação patológica. Nos 3 anos seguintes até julho de 1924, 317 neonatos – 67 dos quais eram nascidos e criados em famílias com ao menos um caso de tuberculose – foram imunizados (30 mg divididos em 3 doses de 10 mg dados via oral). Este período serviu para observar os efeitos da vacinação em uma escala maior e, se não mais importante, para estudar a possibilidade de reversão da virulência uma vez inoculado no hospedeiro humano (CALMETTE, 1931).

Nos 7 anos seguintes, quase 1 milhão de crianças foram vacinadas, fato que coincidiu com uma significativa queda na mortalidade infantil e apesar dos questionamentos da época levantados pela comunidade científica a respeito da eficácia do bile-bacilo na prevenção da

tuberculose, sua utilização foi adotada pela Liga das Nações em 1928, sendo também distribuído a pesquisadores do mundo todo que, por sua vez, implantaram a produção da vacina em suas instituições de origem (CALMETTE, 1931).

O incidente de Lubeck, na Alemanha em 1930 foi um marco negativo na história da vacina – adiando sua adoção definitiva na prevenção à tuberculose. Naquele ano, 250 neonatos da referida cidade foram acidentalmente inoculados com uma preparação de BCG contaminada com 2/3 de *M. tuberculosis* e contendo apenas 1/3 de BCG, ocasionando a morte de 73 destas crianças. Apesar dos fatos terem sido esclarecidos, o caso reduziu a aceitação da população quanto à vacina. (BENEVOLO-DE-ANDRADE et al., 2005). Os números exatos são contraditórios na literatura científica, mas se aproximam destes aqui citados (DANIEL, 2005). Este incidente demonstra que o desenvolvimento da patologia depende bastante do hospedeiro infectado. Apesar da inoculação direta com 3 doses de *M. tuberculosis* administradas oralmente logo aos primeiros dias de vida destes neonatos, pouco mais de 25% faleceram em seu 1º ano de vida. Cerca de 55% desenvolveram complicações em maior ou menor grau devido à tuberculose e os 20% restantes não demonstraram sintoma algum, tornando-se apenas positivos ao teste da tuberculina.

Somente após o término da 2ª Guerra Mundial e com o risco crescente de uma epidemia é que a vacina começou a ser extensivamente utilizada na prevenção da tuberculose (BEHR, 2002). Desde então, a vacina BCG é utilizada sistematicamente em diversos países, sendo dentre todas as vacinas, a mais utilizada e a única disponível na prevenção da tuberculose (BEHR, 2002). No Brasil, Arlindo de Assis – considerado o pai da vacina BCG – implantou sua produção na atual Fundação Atila de Paiva após recebê-la de Julio Elvio Moreau – dando origem ao nome da subcepa brasileira, BCG Moreau (BENEVOLO-DE-ANDRADE et al., 2005).

Desde a distribuição da cepa BCG original pelo Instituto Pasteur a quase um século atrás, as diferentes condições de cultivo e estocagem de cada instituição geraram profundas alterações entre a vacina original e as subcepas derivadas (Figura 1). Uma análise a nível genômico entre as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis* e as subcepas de BCG evidencia uma série de mutações, especialmente a deleção de grandes fragmentos genômicos, denominados de RD (do inglês “*region of difference*”), (BROSCH et al., 2007), apontadas como uma das principais causas na atenuação da virulência de BCG (GOMES et al., 2011). Outras mutações em comparação ao genoma de *M. bovis* são observadas como as regiões denominadas DU (do inglês “*tandem duplication*”) ou deleções e inserções em genes específicos. Sendo umas das

cepas mais próximas, histórica e geneticamente à cepa original, a subcepa Moreau é considerada uma das mais imunogênicas (HAYASHI et al., 2009; KOZAK; BEHR, 2011).

Figura 1 – Filogenia genética das subcepas de BCG. A comparação genômica entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* evidencia 8 RD (RD4 – RD11). A atenuação de BCG exclui a RD1 e possivelmente a RD3. Cada subcepa de BCG demonstra deleções RD específicas e a inserção de regiões de duplicação em tandem DU. Algumas cepas exibem características específicas: as substituições E178K e L47P no gene *crp* (cAMP receptor protein), a perda de um elemento de inserção IS6110, a substituição M1I que inativa a expressão de MPB70 e MPB83, a deleção de N-RD18 que une Rv1189 e Rv1191 em fase, a deleção de Rv1810 e a deleção no códon 91 do gene *phoR*.
Fonte: (BROSCH et al., 2007).

1.2 Características da vacina BCG

A profilaxia da tuberculose é realizada através da imunização com BCG e convenientemente, há muitas vantagens próprias da vacina como sua segurança e eficácia com raros casos de reações adversas, inclusive sendo recomendada pela Organização Mundial de Saúde – OMS, na imunização de neonatos. Toda a cadeia de imunização, desde a fabricação, transporte e armazenamento favorecem-se da sua estabilidade ao calor e do baixo custo de produção da vacina. Suas propriedades adjuvantes da resposta imune (KHALIL et al., 2006) e

também por isso, tem sido utilizado no tratamento de câncer de bexiga superficial ou carcinoma *in situ* (KAWAI et al., 2013; SHELLEY et al., 2000)

Acredita-se que a imunogenicidade e consequente proteção esteja associada à persistência do bacilo no organismo imunizado. Em modelos animais, a persistência do bacilo depende da espécie hospedeira, da subcepa de BCG utilizada e da via de administração (KOZAK; BEHR, 2011; LEVERSEN et al., 2012; SAXENA et al., 2002).

Atualmente no Brasil, a vacinação com BCG é dada via intradérmica ou percutânea, porém, seguindo o modelo adotado por Calmette e Guérin no início da vacinação com BCG, a vacina já foi administrada em crianças pela via oral. A via de inoculação pode influenciar na intensidade, foco e duração da resposta imune. Em geral, a imunização via oral ou intranasal proporciona uma maior carga de bacilos nos pulmões, ao passo que a imunização via intradérmica ou intraperitoneal concentra os bacilos no baço e linfonodos drenantes locais (LAGRANDERIE et al., 1997a,b) . Além disso, os bacilos podem persistir no organismo hospedeiro por até 16 semanas após a imunização, estimulando continuamente o sistema imune do hospedeiro (KREMER et al., 1998).

Independentemente da via, doses menores, p.ex. abaixo de 10^5 CFU (do inglês “*colony forming unit*”) no modelo murino, tendem a direcionar a resposta imune a um perfil Th1 – indicado para patógenos intracelulares p.ex. – e doses maiores, p.ex. acima de 10^7 CFU, a um perfil Th2 (DENNEHY; WILLIAMSON, 2005). Por outro lado, ao utilizarmos doses maiores ou várias doses de rBCG podemos direcionar o sistema imune ao perfil Th2 (NURUL; RAPEAH; NORAZMI, 2010), que pode ser interessante quando se busca a atuação de anticorpos específicos, inclusive do tipo neutralizantes (KREMER et al., 1996)

Utilizando 10^5 CFU da cepa BCG Connaught (ATCC #35745) inoculada via intratraqueal em camundongos C57BL/6 observamos que estes bacilos permanecem em grande número nos pulmões até a 5ª semana. Também se disseminam rapidamente por outros órgãos como linfonodos mediastinais e baço, onde a CFU se eleva rapidamente nas duas primeiras semanas e se mantém constante pelo menos até a 14ª semana. Até a 2ª semana, os pulmões apresentam alguns poucos agregados inflamatórios, compostos por linfócitos e macrófagos e, em menor quantidade, neutrófilos (Figura 2, B-C). No pico da infecção, entre a 3ª e a 5ª semana, se observa uma intensa infiltração linfocitária composta principalmente por macrófagos ativados (macrófagos maiores com núcleos alargados e citoplasma eosinofílico) (Figura 2, D-E). Entre a 6ª e a 8ª semana, quando a infecção está controlada, ainda se observa um grande infiltrado celular composto principalmente de linfócitos (Figura 2, F-G) (FULTON et al., 2000).

Figura 2 – Pulmão de camundongos infectados com BCG. A) Histologia normal do pulmão demonstrando uma ramificação do brônquio (seta) e um artéria (a). B e C) Agregados inflamatórios (setas) ao lado dos brônquios (b). D) Intenso infiltrado celular ao redor as artérias (seta) e brônquios (b) contendo macrófagos ativados (seta em E). F) Infiltrado composto principalmente por linfócitos (seta) e macrófagos (seta em G). Coloração por hematoxilina e eosina.

Fonte: (adaptado de (FULTON et al., 2000)).

Ozeki e colaboradores demonstram que a imunização com BCG (via intraperitoneal) é capaz de fornecer proteção contra um posterior desafio 20 semanas após a imunização, mas não com o dobro do tempo, na 40ª semana. A proteção é relacionada ao tipo de resposta imune, mais associada ao perfil do tipo Th1 no primeiro momento com altos níveis de IFN- γ , mudando para um perfil mais Th2 posteriormente com altos níveis de IL-4 e IL-5 nos linfonodos drenantes locais (OZEKI et al., 2011).

Kaveh e colaboradores, demonstram existir proteção mesmo 1 ano após a imunização (via intradérmica) com 2×10^5 CFU de BCG subcepa Danish 1331 e desafio intranasal com *M. bovis*, utilizando camundongos BALB/c. Neste modelo, a proteção também relaciona-se à maior concentração de células produtoras de IFN- γ e a presença de células T CD4⁺ multifuncionais capazes de produzir mais de uma citocina (KAVEH et al., 2011).

Quando instilado ou injetado via intravesical, o BCG adere às células da superfície do urotélio e é internalizado resultando na secreção de diversas moléculas imunoestimulatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e GM-CSF no lúmen urotelial. Como consequência, ocorre um influxo leucocitário diversificado – constituído de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, células dendríticas e células NK – que, por sua vez, produz mais citocinas e quimiocinas (LUO; HENNING; O'DONNELL, 2011). Apesar do desconhecimento dos mecanismos de ação, o BCG é eficiente na diminuição da recorrência e redução na progressão do tumor (KIM; STEINBERG, 2001).

1.3 O BCG recombinante

Desenvolvida há quase 100 anos e administrada em mais de 3 bilhões de indivíduos de todas as partes do mundo, a vacina de BCG hoje é base de processos de melhoramento através da biologia molecular associada à vacinologia reversa.

Desde a geração dos primeiros vetores de expressão em micobactéria (JACOBS et al., 1989) o objetivo fundamental é produzir uma vacina multivalente que se beneficie das propriedades vantajosas do BCG. Diversas cepas de BCG recombinante (rBCG) foram desenvolvidas com a capacidade de expressar antígenos proteicos de diferentes patógenos, com alguns casos de resposta imune protetora. Tais trabalhos incluem tanto a expressão de antígenos de organismos eucariotos mais complexos como helmintos, e unicelulares como protozoários; quanto de procariotos mais simples como bactérias, além de antígenos de vírus e proteínas imunoestimulatórias como toxinas e citocinas (BASTOS et al., 2009).

Anterior ao desenvolvimento das cepas recombinantes, o BCG era utilizado como adjuvante da resposta imune, apenas misturado a extratos antigênicos de parasitas como *Leishmania* (FORTIER et al., 1987) ou *Schistosoma* (JAMES; PEARCE, 1988; JAMES; PEARCE; SHER, 1987). O racional destas abordagens baseia-se na indução de citocinas como IFN- γ e IL-2 e ativação de macrófagos, características do perfil tipo Th1 da resposta celular efetora – proporcionadas justamente pela adjuvância do BCG.

1.3.1 Vetores de expressão micobacterianos

Historicamente, os primeiros vetores desenvolvidos para modificar geneticamente espécies micobacterianas (Quadro 1) foram criados pela combinação aleatória de sequências genéticas do micobacteriófago TM4 de *M. avium* ou do fago temperado L1 à um cosmídeo de

E. coli. Estes plasmídeos-ponte *E. coli*-micobactéria, denominados de fasmídeos, replicam-se como plasmídeo em *E. coli* e podem se replicar em micobactéria como fagos (JACOBS; TUCKMAN; BLOOM, 1987) ou integrar-se em sítios específicos no DNA genômico (SNAPPER et al., 1988).

Quadro 1 – Primeira geração de vetores para recombinação em micobactéria

IDENTIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
pHC79	Cosmídeo de <i>E. coli</i> . Possui origem de replicação ColE1 e gene de resistência à ampicilina.	(JACOBS; TUCKMAN; BLOOM, 1987)
phAE1	Selecionado por resistência à ampicilina da mistura de fragmentos genômicos de fago TM4 e cosmídeo pHC79. Replica-se em <i>M. smegmatis</i> e <i>E. coli</i> .	
phAE15	Substituindo o fago TM4 pelo temperado L1, e misturado ao cosmídeo pHC79.	(SNAPPER et al., 1988)
phAE19	Inserção do gene <i>aph</i> conferindo resistência à canamicina, no fasmídeo phAE15.	
pIJ666	Plasmídeo contendo gene neo de resistência a neomicina/canamicina, a origem de replicação P15A, e o gene <i>cat</i> de resistência à cloranfenicol	
pYUB12	Mistura dos fragmentos plasmidiais de pAL5000 de <i>M. fortuitum</i> e pIJ666.	

Esta primeira geração de plasmídeos-ponte demonstrou a possibilidade de se transformar geneticamente espécies micobacterianas. No entanto, seu tamanho, falta de sítios de restrição adequados para clonagem e sua instabilidade em BCG na ausência de antibióticos tornavam estes vetores pouco práticos.

Na segunda geração, graças a identificação das sequências funcionais de cada fragmento (Quadro 2), novos plasmídeos-ponte foram construídos, denominados pMV261 e pMV361, ainda utilizados atualmente (STOVER et al., 1991). São variados os elementos que podem estar presentes em um vetor micobacteriano, mas essencialmente se observam: um gene marcador de resistência a antibiótico ou gene de complementação auxotrófica, origem de replicação em *E. coli* para expansão do plasmídeo, origem de replicação em micobactéria ou sítio para integração ao genoma, promotor ativo em micobactéria autólogo ou oriundo de p.ex. micobacteriófagos e sítios de enzimas de restrição para inserção de sequências de interesse (BASTOS et al.).

Quadro 2 – Descrição dos fragmentos genéticos presentes em vetores micobacterianos frequentemente usados

FRAGMENTO	VETOR	DESCRIÇÃO
<i>oriM</i>	pMV261 (STOVER et al., 1991)	Origem de replicação oriunda de <i>M. fortuitum</i> .
<i>oriE</i>		Origem de replicação oriunda de pBR322
<i>aph</i>		Confere resistência à canamicina oriundo de Tn903
<i>phsp60</i>		Promotor da proteína hsp60 oriundo de BCG incluindo os primeiros 6 aminoácidos
<i>rrnAB_T1</i>		Terminador transcricional
<i>MCS</i>		Sítio de multiclonagem
<i>attP</i> e <i>int</i>	pMV361 (STOVER et al., 1991)	Sítio e gene para integração ao genoma oriundos do micobacteriófago L5.
	pYUB1336 (SWEENEY et al., 2011)	Plasmídeo utilizado para a gerar IKEPLUS, a cepa de <i>M. smegmatis</i> capaz de proteger contra o desafio de <i>M. tuberculosis</i> . Integra-se ao genoma no sítio <i>attP</i> .
	phAE159 (SWEENEY et al., 2011)	Derivado do fago TM4, possui a capacidade de inserir fragmentos de até 10 kb no genoma micobacteriano.
<i>pBlaF*</i>	pLA71 (LIM et al., 1995)	Promotor da β -lactamase de <i>M. fortuitum</i> modificado.
<i>Shine-Dalgarno</i>	pMIP12 (LE DANTEC et al., 2001)	Sequência codificante para um sítio RBS de ligação ribossomal.
<i>c-myc epitope tag</i>	pJEX65 (SPRATT et al., 2005)	Marcador geneticamente ligado a porção terminal do gene a ser transcrito utilizado para facilitar a detecção da proteína traduzida.
<i>Sequência sinal</i>	pJEX65 (SPRATT et al., 2005) pLA71 (NASCIMENTO et al., 2000)	Uma sequência sinal para exportação ou direcionamento à membrana justaposto ao ATG. Pode ser derivada do antígeno alfa de <i>M. tuberculosis</i> , Ag85B de BCG ou β -lactamase de <i>M. fortuitum</i>
<i>Ms6</i> e <i>Giles</i>	pML1361 e pML1357 (HUFF et al., 2010)	Sítios de integração do genoma micobacteriano.

Estes recursos genéticos utilizados na transformação micobacteriana apresentam vantagens e desvantagens associadas. Os vetores integrativos tendem a ser mais estáveis ao passo que vetores extracromossomais, por manterem mais cópias, geralmente exibem maiores níveis de expressão (STOVER et al., 1991). A escolha do promotor utilizado para direcionar a expressão do gene de interesse é essencial, pois será um dos fatores mais determinantes na

expressão do mesmo. A presença de uma sequência sinal após o códon de iniciação pode direcionar a exportação da proteína de interesse para compartimentos subcelulares específicos ou ao ambiente extracelular. Uma sequência Shine-Dalgarno, anterior ao códon de iniciação, será um sítio RBS no mRNA transcrito (do inglês, “*ribosome binding site*”) e poderá auxiliar na tradução da proteína. Já a utilização de genes sintéticos com códon otimizado para micobactéria adequa a tradução para uso de tRNAs mais abundantes facilitando assim o processo de tradução (DENNEHY; WILLIAMSON, 2005). Além de otimizarmos o cassette de expressão compreendendo promotor e gene, é possível otimizar a região da origem de replicação elevando a estabilidade e o nível de expressão (GRIFFIN; WILLIAMSON; CHAPMAN, 2009).

1.3.2 Promotores micobacterianos

Além do promotor de *hsp60* utilizado nos vetores da 2ª geração pMV261 e pMV361, outros promotores também foram empregados com sucesso. São os promotores de *hsp70* de BCG, do antígeno alfa de *M. kansasii*, da IS900 ORF de *M. paratuberculosis* (P_{AN}), o promotor da proteína de 19 kDa de *M. tuberculosis*, da proteína de 18 kDa de *M. leprae* e o promotor da β -lactamase de *M. fortuitum*, pBlaF* (BASTOS et al., 2009). Este último é bastante utilizado por nosso laboratório, inserido nos plasmídeos pLA71, pLA73 e pMIP12.

Alguns promotores podem ser induzidos em ocasiões específicas. O promotor da proteína de 18 kDa de *M. leprae* aparenta induzir maior expressão da β -galactosidase clonada à jusante, durante a infecção do macrófago e menor *in vitro*. Já o promotor de *hsp60* de BCG aparenta induzir expressão de forma mais constitutiva (DELLAGOSTIN et al., 1995), apesar de ser induzível em certas condições de estresse, como a súbita elevação de temperatura de 37 a 45°C (BATONI et al., 1998). Paralelamente, o promotor de *hsp60* pode proporcionar mais instabilidade ao plasmídeo que outros promotores, como o promotor da proteína de 18 kDa de *M. leprae* e do antígeno 85A de *M. tuberculosis* (AL-ZAROUNI; DALE, 2002).

Ao conseguirmos definir níveis de expressão ou direcionamento precisos, podemos controlar mais eficientemente a resposta imunológica necessária à vacina multivalente. Os promotores e vetores micobacterianos, assim como outros componentes regulatórios importantes (Quadro 2) são revisados por Bastos (BASTOS et al., 2009).

1.3.3 Expressão de citocinas em BCG recombinante

A expressão em BCG de moléculas imunoestimulatórias, como a citocina IL-2, altera o perfil da resposta imune induzida pela vacina e muito se investiga estas inclusões para melhorar as propriedades adjuvantes do BCG (YAMADA et al., 2000). Um fato interessante é que pequenas diferenças na construção do vetor micobacteriano possuem um grande impacto na capacidade de cada cepa de rBCG modular a resposta imune do hospedeiro imunizado. Por exemplo, um vetor micobacteriano expressando IL-2 sob o direcionamento de uma sequência sinal de exportação oriunda do alfa antígeno de BCG é capaz de modificar a produção das citocinas IL-2 e IFN- γ (O'DONNELL et al., 1994) e o perfil de isotipos IgG1 e IgG2a (YOUNG; O'DONNELL; BUCHAN, 2002).

A expressão de IL-18 em BCG também promove a modulação da resposta imune induzindo principalmente IFN- γ , em camundongos C57BL/6, podendo ser um efeito específico para cada linhagem do modelo murino. Um efeito interessante está na menor recuperação em CFU destes rBCGs dos animais imunizados. Tal fato, indica que a potencialização da resposta imune pelo rBCG ao expressar moléculas imunoestimulatórias também pode resultar na sua maior eliminação pelo organismo hospedeiro (LUO et al., 2004; SLOBBE et al., 1999). Ao interferir na persistência do bacilo no organismo poderíamos, por outro lado, comprometer sua eficiência como vacina protetora.

1.3.4 Expressão de citolisinas em BCG recombinante

Os acontecimentos que seguem a imunização de BCG são: o BCG é fagocitado por macrófagos residentes e contido no fagossomo destes. Uma parte dos bacilos imunizados consegue sobreviver por longos períodos ao elevar o pH do fagossomo para um pH neutro, e ao inibir a fusão do fagossomo ao lisossomo. Outra parte dos bacilos é processada e seus antígenos apresentados especialmente ao sistema imune via MHC de classe II – estimulando preferencialmente a ativação de linfócitos T CD4⁺.

A expressão de proteínas citolíticas como a listeriolisina O de *Listeria monocytogenes* em BCG visa o escape do bacilo ou de seus antígenos através da perfuração da membrana do fagossomo e apresentação antigênica via MHC de classe I – elevando a resposta de linfócitos T CD8⁺ (CONRADT; HESS; KAUFMANN, 1999; HESS et al., 1998).

Se a atividade da proteína é importante ao propormos BCG recombinante, será necessário analisar o ambiente intrafagossomal em que se localiza o BCG. O pH do neutro do

fagossomo contendo os bacilos de BCG contrasta com o pH ótimo para a atividade da listeriolisina de 5,8. A construção de uma cepa de BCG deletada do locus para urease C (REYRAT; BERTHET; GICQUEL, 1995) inibe a capacidade do BCG de neutralizar o pH intrafagossomal e, de fato, este BCG Δ ureC expressando a listeriolisina em um pH ótimo para sua atividade citolítica é mais imunogênico (CONRADT; HESS; KAUFMANN, 1999) (DESEL et al., 2011) e, como vacina, induz maior proteção contra a infecção de *M. tuberculosis* (GRODE et al., 2005). Esta cepa atualmente denominada VPM 1002 encontra-se em ensaios clínicos de fase II (BRENNAN; THOLE, 2012). De maneira similar, a criação de um rBCG (AERAS-422) que possui integrado ao seu genoma o cassete de expressão da perfringolisina O de *Clostridium perfringens* exatamente no locus da urease C e, complementado pela adição de antígenos imunodominantes de *M. tuberculosis*, também encontra-se em ensaio clínico de fase I (SUN et al., 2009).

1.3.5 Expressão dos fragmentos RD perdidos na atenuação do BCG

Os fragmentos genômicos RD perdidos durante o processo de atenuação do BCG contêm várias ORFs (do inglês “*open reading frame*”) que, se reintroduzidas, aumentam a imunogenicidade da vacina. Um dos fragmentos genômicos mais importantes, contido no genoma de *M. bovis* patogênico, mas não em *M. bovis* BCG é a região RD1. Em suas 9,5 kb estão distribuídas 9 ORFs e alguns promotores putativos, incluindo o sistema de secreção *esx-1* responsável pela exportação dos antígenos imunodominantes CFP-10 (do inglês “*10 kDa culture filtrate protein*”) e ESAT-6 (do inglês “*6 kDa early secretory antigenic target*”).

Esta região RD1 é considerada essencial na atenuação do BCG, pois está presente somente nas cepas patogênicas, *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Além disso, a deleção da região RD1 em *M. tuberculosis* diminui significativamente sua virulência em animais experimentais infectados, possivelmente por inibir a citólise das células infectadas e a consequente invasão de outras células (HSU et al., 2003). Já a reintrodução deste fragmento em BCG aumenta sua persistência no organismo hospedeiro infectado e eleva sua imunogenicidade (PYM et al., 2003).

Uma possível explicação pode estar na capacidade de perfuração de membranas proporcionada pelo sistema ESX-1. A deleção da região RD1 no genoma de *M. tuberculosis* inibe a translocação dos bacilos fagocitados pelo macrófago fagossomo ao citosol e, reciprocamente a introdução da região RD1 em BCG promove seu escape do fagossomo (HOUBEN et al., 2012), uma correlação clara entre a região RD1 e a patogênese.

1.3.6 Expressão de antígenos heterólogos

O BCG tem sido usado para a apresentação de antígenos heterólogos de diversos patógenos, vírus bactérias e parasitas. Por ser uma bactéria intracelular e induzir uma resposta imune do tipo Th1, torna-se apropriada para o desenvolvimento de uma vacina contra patógenos que requerem este tipo de resposta imune para proteção.

Em nosso laboratório, foi demonstrado que a imunização com o rBCG, expressando a subunidade 1 da toxina PT de *Bordetella pertussis* (NASCIMENTO et al., 2000), é eficaz na proteção de camundongos desafiados com o patógeno. Por induzir uma resposta imune do tipo Th1, esta cepa foi utilizada terapeuticamente em modelo de câncer de bexiga em camundongos. O tratamento com este rBCG foi capaz de diminuir o tamanho do tumor e aumentar a sobrevivência dos animais quando comparado com os animais tratados com BCG selvagem (ANDRADE et al., 2010).

Para muitos modelos de proteção em animais experimentais relacionados à atuação da resposta imune do tipo Th1, como nos casos de *Leishmania spp.*, *Plasmodium spp.* ou *Toxoplasma gondii*, coincidentemente, parasitas intracelulares, o BCG tem sido utilizado por sua adjuvância (BASTOS et al., 2009; OHARA; YAMADA, 2001)

Camundongos imunizados com a forma recombinante de BCG expressando a proteinase gp63, antígeno de superfície comum às espécies de *Leishmania* como *L. major* e *L. mexicana*, quando desafiados com as formas mastigota e amastigota do protozoário *L. mexicana* demonstram uma lesão cutânea diminuída (CONNELL et al., 1993). Outra cepa de rBCG expressando o mesmo antígeno gp63 demonstra diminuir a lesão cutânea causada pelo desafio de *L. major* (ABDELHAK et al., 1995). Estes casos demonstram o efeito determinante que a dose de rBCG e via de administração causam na diminuição ou não da lesão cutânea. Abdelhak e colaboradores ainda observam que um sistema de expressão é mais efetivo que outro na diminuição da lesão (ABDELHAK et al., 1995).

Outros antígenos de parasitas também foram expressos sob a forma de rBCG, como: CSP (do inglês “*circumsporozoite surface protein*”) (ARAMA et al., 2012; HAESELEER et al., 1993) e MSP-1 (do inglês “*merozoite surface protein-1*”) (NURUL; RAPEAH; NORAZMI, 2010) ou MSP-2 do gênero *Plasmodium* (ZHENG; XIE; CHEN, 2002). Cada cepa de rBCG construída demonstra ser capaz de estimular especificamente o sistema imune e há indícios de que essa estimulação é dada pela persistência do bacilo no organismo, uma vez que a imunização com bacilos mortos por calor não estimulam eficientemente o sistema imune (ZHENG; XIE; CHEN, 2002).

De *Toxoplasma gondii*, foram construídas cepas de rBCG expressando os antígenos ROP-2 (do inglês “*rhoptry protein 2*”) e GRA-1 (do inglês “*granule antigen 1*”) também com a demonstração de resposta imune específica porém os dados de proteção – determinados pela sobrevivência de camundongos infectados – demonstram uma pequena diferença em relação ao grupo imunizado unicamente com BCG selvagem (SUPPLY et al., 1999; WANG et al., 2007).

Em um dos poucos estudos publicados de humanos imunizados com rBCG, o rBCG expressando o antígeno OspA (do inglês “*outer surface protein A*”) de *Borrelia burgdorferi* foi administrado a indivíduos adultos em diferentes doses. A maior parte dos indivíduos administrados com as maiores doses de rBCG tornam-se PPD positivo (preparação antigênica de BCG, do inglês “*purified protein derivative*”), contudo anticorpos específicos anti-OspA não são detectados (EDELMAN et al., 1999).

Os antígenos Sm14 (do inglês “*fatty acid binding protein*”) e Sm28GST (do inglês “*glutathione S-transferase*”) de *Schistosoma mansoni* já foram expressos de forma heteróloga em rBCG (KREMER et al., 1996; VARALDO et al., 2004). O rBCG expressando Sm14 desenvolvido em nossos laboratórios, foi capaz de induzir uma resposta imune específica em animais experimentais imunizados. Ao desafiar estes animais com cercárias, a forma infectante de *S. mansoni*, verificou-se um alto nível de proteção (VARALDO et al., 2004).

Apesar de diversas cepas de rBCG terem sido geradas com a habilidade de expressar diferentes antígenos e outras moléculas, uma das grandes limitações de uma vacina multivalente baseada em BCG recombinante está nos níveis de expressão destes genes inseridos. Vários são os fatores que determinam a expressão em BCG como: o conteúdo GC e utilização de códons do gene inserido especialmente se heterólogo. O alto conteúdo GC de genomas micobacterianos e conseqüentemente os códons disponíveis às micobactérias faz com que os genes de organismos com alto conteúdo AT em seus genomas tenham sua tradução dificultada (DENNEHY; WILLIAMSON, 2005).

Por fim, por ser uma vacina inserida atualmente no calendário de imunização de muitos países, a implantação e aceitação de uma vacina recombinante baseada no BCG possuiria maiores chances de sucesso.

1.4 Doenças tropicais negligenciadas

O advento de medidas sanitárias e o desenvolvimento de novos antibióticos de amplo espectro assim como a adoção de medidas profiláticas não conseguiu erradicar os malefícios

impostos pelas doenças infecciosas, que persistem como a principal causa pela morte de crianças no mundo inteiro (W.H.O., 2012), especialmente dada a localização destas doenças concentradas nos países subdesenvolvidos onde condições sanitárias e o acesso a quimioterápicos é deficitário.

Neste contexto, as doenças tropicais negligenciadas ou NTDs (do inglês “*neglected tropical diseases*”) representam um segmento especialmente sensível à saúde pública, pois comumente restringem-se às populações mais pobres (Figura 3) (HOTEZ et al., 2009).

Figura 3 – Distribuição e co-incidência geográfica das doenças negligenciadas mais prevalentes. São malária, esquistossomose, leishmaniose, helmintíases transmitidas pelo solo, ascaridíase, tricuríase, filariose linfática, tracoma, oncocisticercose, doença de Chagas, dengue e tripanossomíase. Os países afetados por cinco (bege), seis (rosa) ou sete (vermelho) doenças estão realçados na figura.

Fonte: (HOTEZ et al., 2009).

As recomendações da OMS para o controle e prevenção de NTDs atualmente se baseiam em: quimioterapia preventiva, controle de vetores, disponibilização de água, sanitização e higiene, controle veterinário e acompanhamento de casos. Estas medidas devem ser adotadas em conjunto e, se não continuadas por longos períodos, há o risco do ressurgimento da doença. Com recursos limitados de ordem humana, financeira e estrutural, a implementação e manutenção de tais programas é de uma logística complexa, por vezes, subestimada e, que pode ser invalidada caso não abranja toda uma área endêmica (W.H.O., 2010).

Quadro 3 – Prevalência, mortalidade e as medidas de controle epidemiológico adotadas para as principais NTDs

DOENÇA	MORTALIDADE	PREVALÊNCIA GLOBAL	MEDIDAS DE CONTROLE
Helmintíases transmitidas pelo solo	24.000 – 415.000	600 milhões	Administrações massivas
Ascaridíase	3.000 – 65.000	800 milhões	Administrações massivas
Trichuriase	3.000 – 60.000	600 milhões	Administrações massivas
Filariose linfática	3.000 – 10.000	120 milhões	Administrações massivas
Esquistossomose	15.000 – 280.000	200 milhões	Administrações massivas
Tracoma	< 500	84 milhões	Estratégia integrada (SAFE)*
Oncocisticercose	< 500	37 milhões	Administrações massivas
Dengue	19.000	50 milhões	Controle do vetor <i>Aedes aegypti</i>
Leishmaniose	51.000	12 milhões	Deteção e controle de casos. Controle de vetor
Doença de Chagas (tripanossomíase americana)	14.000	8 – 9 milhões	Controle de vetor (triatomíneos)
Tripanossomíase africana	48.000	< 100.000	Deteção e controle de casos. Controle de vetor.

*SAFE: sigla para a estratégia que adota cirurgia (S), antibióticos (A), limpeza facial (F) e controle ambiental (E)

Fonte: Adaptado de (HOTEZ et al., 2009):

1.5 A esquistossomose e o parasita *Schistosoma mansoni*

Uma destas doenças tropicais negligenciadas de maior prevalência é a esquistossomose. São mais de 200 milhões de pessoas afetadas ao redor do mundo, especialmente em 74 países, cuja situação de endemia (GRYSEELS et al., 2006) coloca sob risco outras 779 milhões. Destas, mais de 90% encontram-se na África subsaariana (HOTEZ; FENWICK, 2009; STEINMANN et al., 2006).

No Brasil (Figura 4), há ocorrência apenas da espécie *S. mansoni*, com estimativas de que 5,4% da população esteja infectada, concentrada em 9 Estados endêmicos (BRASIL, 2011). Todavia, a falta de dados fidedignos pode subestimar as estatísticas de distribuição e prevalência (PIERI; FAVRE, 2007). Segundo o Ministério da Saúde, somente em 2011 foram notificados mais de 63 mil casos de esquistossomose no país. A maioria dos casos ocorrem nos estados de Minas Gerais, Alagoas, Pernambuco, Sergipe e Bahia (BRASIL, 2012).

Figura 4 – Distribuição da esquistossomose no Brasil. A ocorrência da doença se concentra principalmente na região nordeste, incluindo Maranhão, Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, Rio Grande do Norte e a Paraíba.
Fonte: (AMARAL et al., 2006).

1.5.1 Controle epidemiológico da esquistossomose

A inexistência de uma vacina profilática, capaz de prevenir a infecção ou diminuir a morbidade da patologia associada à esquistossomose, torna o controle da doença baseado na administração quimioterápicos como a oxamniquina (OXA) e o praziquantel (PZQ). O PZQ possui uma alta eficácia, baixa toxicidade e baixo custo de produção o que a torna a droga de escolha tanto em tratamentos curativos individuais quanto nas administrações massivas de populações de áreas endêmicas (VAN DER WERF et al., 2003).

Apesar de ser aceita como mecanismo de controle – até mesmo pela indisponibilidade de uma alternativa viável – a adoção da quimioterapia massiva e periódica é preocupante. Em primeiro lugar, ela não impedirá a reinfecção do paciente e pode selecionar as cepas menos susceptíveis ao fármaco, fato já observado em laboratório. Outro questionamento diz respeito à eficácia em campo onde as taxas de cura variam bastante atingindo uma taxa mínima de 60%, todavia taxas de 100% de cura nunca foram reportadas (DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008). Por fim, as estimativas mais atuais apontam para menos de 10% a

população endêmica que esteja recebendo algum tratamento de forma continuada (HOTEZ; FENWICK, 2009).

No cenário atual, o praziquantel é virtualmente a única droga eficaz no cuidado profilático e terapêutico da esquistossomose. Com poucas alternativas, e até mesmo pela falta de conhecimento sobre seu mecanismo de ação a nível molecular (DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008; GREENBERG, 2005), cresce a preocupação sobre os efeitos deletérios de seu uso massivo e continuado.

1.5.2 Ciclo de vida do *S. mansoni*

Na história natural da doença (Figura 5), o hospedeiro humano infectado libera os ovos do parasita nas fezes, que ao entrarem em contato com a água, eclodem em miracídeos que, por sua vez, infectam o hospedeiro intermediário, o caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata*. No caramujo, sucessivas gerações de esporocistos geram as cercárias, que uma vez liberadas no meio aquático são capazes de infectar o hospedeiro humano através da pele (C.D.C., 2008).

No hospedeiro humano, as cercárias atravessam as camadas da epiderme e derme, perdem a cauda bifurcada transformando-se em esquistossômulos que, continuam migrando até o sistema sanguíneo e linfático. Uma vez na corrente circulatória, seguem o fluxo e migram passivamente através dos vasos chegando aos pulmões e, passando pelo ventrículo esquerdo do coração – finalmente chegam ao fígado. Neste órgão, encontram o ambiente ideal para desenvolverem-se em vermes adultos machos e fêmeas. Estes vermes formam casais e migram para as veias mesentéricas onde as fêmeas promovem sua oviposição. Estes ovos, ou seguem a corrente sanguínea e acabam presos nos microcapilares do fígado, ou eventualmente atravessam o lúmen das veias e mucosa intestinal sendo excretados junto às fezes, assim reiniciando o ciclo (PEARCE; MACDONALD, 2002; ROSS et al., 2002).

As cercárias atenuadas com uma dose ótima de irradiação penetram a pele igualmente às cercárias normais e também são capazes de desenvolver-se em esquistossômulos. A grande maioria atravessa as camadas da pele e migra intravascularmente até aos pulmões (Figura 6). Apenas uma pequena fração dos parasitas penetrantes consegue ultrapassar os pulmões e cerca de 10% destes são encontrados no fígado e órgãos sistêmicos (Figura 6d, Figura 6e). Porém, parasitas atenuados com altas doses de radiação gama morrem na pele e não migram aos pulmões, tampouco induzem proteção. Por isto, acredita-se que a sensibilização da pele, por meio das células T dérmicas e dos linfonodos drenantes locais ou sDLN (do inglês “*skin draining lymph nodes*”) não são suficientemente fortes para induzir uma resposta imune adequada (HEWITSON; HAMBLIN; MOUNTFORD, 2005). Ainda, a sensibilização do pulmão é essencial na contenção dos parasitas e até mesmo em animais *naive* o pulmão é o principal órgão de atrito à migração do parasita (WILSON, R. A.; COULSON, 2009).

Figura 6 – Migração dos parasitas no modelo murino. O número de parasitas *S. mansoni* nos diferentes órgãos A) pele, B) total, C) pulmões, D) órgãos sistêmicos e E) fígado, baço e intestinos, indica o padrão de migração, em camundongos previamente imunizados com cercárias irradiadas e desafiados (linha pontilhada) ou apenas infectados (linha contínua). Fonte: (WILSON, R. A.; COULSON, 2009).

A indução de proteção por cercárias irradiadas baseia-se na hipótese de que ao migrar mais lentamente (Figura 6) o parasita irradiado interaja mais intimamente com o sistema imune do hospedeiro (Figura 7b). Já na pele, uma parcela morre e tem seus antígenos sequestrados pelos linfonodos enquanto a outra parcela hábil em migrar persiste por mais tempo nos linfonodos drenantes locais (Figura 7a). Este primeiro estímulo na pele promove uma intensa proliferação de células T efectoras específicas (WILSON, R. A.; COULSON,

2009), que são liberadas na corrente circulatória. Quando os parasitas irradiados hábeis em migrar chegam aos pulmões, estas células são recrutadas pelos linfonodos mediastinais e se desencadeia um intenso influxo de leucócitos da circulação para o parênquima pulmonar e vias respiratórias. Em sua grande maioria estas células são linfócitos T $CD4^+$, uma minoria $CD8^+$ e apenas 5% são linfócitos B (COULSON; WILSON, 1997; WILSON, R. A.; COULSON, 2009).

Figura 7 – Interação dos parasitas atenuados por radiação com o sistema imunológico no modelo murino. (a) Célula dendrítica (DC) em contato com a superfície de um esquistossômulo atenuado (S) no sDLN. Escala = 0,1 μ m. (b) Contato do endotélio capilar do pulmão (EN) e o esquistossômulo (T). Escala = 0,25 μ m. (c) Esquistossômulo do desafio (S) no pulmão de um camundongo imunizado cercado por um foco inflamatório predominantemente composto por linfócitos e monócitos. Escala = 50 μ m. Fonte: (WILSON, R. A.; COULSON, 2009).

Quando o desafio é realizado com parasitas viáveis, os pulmões do camundongo – já sensibilizados – rapidamente armam um foco inflamatório composto principalmente de linfócitos T $CD4^+$ e macrófagos em torno dos esquistossômulos (Figura 7c), que impedem a continuidade da migração (COULSON; WILSON, 1997; WILSON, R. A.; COULSON, 2009). Acredita-se que a proteção, neste modelo, seja proveniente da rapidez com que as células, principalmente linfócitos T, desencadeiam o foco inflamatório ao redor dos parasitas, bloqueando a migração (WILSON, R. A.; COULSON, 2009).

Supõe-se que a proteção, neste modelo, não seja determinada por mecanismos citotóxicos, pois apesar de os parasitas não se desenvolverem se deixados *in situ*, eles encontram-se morfológicamente inalterados e, ainda, se forem recuperados e injetados na veia porta de camundongos *naive*, desenvolver-se-ão normalmente em vermes adultos (WILSON,

R. A., 1992). Ambos os perfis tipo Th1 e Th2 da resposta imune parecem ter sua importância, especialmente nas situações em que mais doses são administradas (HOFFMANN et al., 1999); no entanto, os maiores níveis de proteção até hoje atingidos, envolveram uma única dose de cercárias irradiadas e a administração de IL-12 recombinante (WYNN et al., 1995), o que favoreceria o perfil Th1 da resposta imune.

1.5.4 Vacinas para esquistossomose

Diferentes estratégias visando o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose foram adotadas valendo-se de vacinas de DNA, peptídeos e proteínas recombinantes associadas em diferentes formulações e adjuvantes, além de vacinas baseadas em vetores vivos, incluindo o BCG (MCMANUS; LOUKAS, 2008; OLIVEIRA et al., 2008; SIDDIQUI et al., 2008).

Alguns dos candidatos mais promissores foram avaliados em um teste conjunto conduzido pela Organização Mundial da Saúde (O.M.S.) em meados de 1990 utilizando os antígenos: IrV5, Sm28GST e Sm14 como proteínas recombinantes, paramiosina em sua forma nativa purificada, TPI e Sm23 como peptídeos sintéticos). O relatório final concluiu que “nenhuma das formulações antigênicas testadas alcançou o limiar pré-estabelecido de 40% ou mais de proteção” (WILSON, R ALAN; COULSON, 2006). Por 40% de proteção entende-se, no modelo animal utilizado, em que o número de vermes recuperados diminui em média 40% nos animais imunizados, em relação ao número de vermes recuperados do grupo não imunizado.

A hipótese por trás dos baixos níveis de proteção no ensaio clínico conduzido pela O.M.S. em parte está na localização destas proteínas no parasita. Excetuando-se a Sm23 que pode estar na superfície do parasita e, portanto, exposta ao sistema imune do hospedeiro, todos os outros antígenos testados possuem localização citosólica ou são componentes do citoesqueleto. A IrV5 (miosina de 68 kDa) e a Sm97 (paramiosina de 97 kDa) são proteínas musculares. A Sm28GST (*glutathione-S-transferase* de 28 kDa), a TPI (*triose phosphate isomerase* de 28 kDa) e a Sm14 (*fatty acid binding protein* de 14 kDa) são enzimas citosólicas.

Há ainda o questionamento a respeito do período, durante o ciclo de vida do parasita, em que estas proteínas estão presentes. A paramiosina e a Sm28GST são encontradas na fase adulta do esquistossômulo. A miosina, a TPI e a Sm23 se encontram em todas as fases. A Sm14 é encontrada nas fases de esquistossômulo e de verme adulto.

Quadro 4 – Características dos antígenos testados pelo O.M.S. em 1996

ANTÍGENO	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO	ESTÁGIO	PROTEÇÃO (%)		
				CAMUNDONGO	RATO	OUTROS
Sm28 (GST)	Citosol	Enzima	Todos	30 – 60	40 – 60	40 (babuíno)
Sm97 (paramiosina)	Músculo	Proteína muscular	Verme adulto e sômulo	30	–	–
IrV5 (miosina)	Músculo	Proteína muscular	Todos	50 – 70	95	25 (babuíno)
TPI	Citosol	Enzima	Todos	30 – 60	–	–
Sm23	Membrana	–	Todos	40 – 50	–	–
Sm14	Citosol e tegumento	Proteína ligadora a ácidos graxos	Verme adulto e sômulo	65	–	100 (coelho)

Supõe-se que antígenos da fase de esquistossômulo seriam os mais interessantes, pois uma vez estabelecidos no fígado, os esquistossômulos irão maturar em vermes adultos, além de ser intrigante a idéia de uma vacina que induza o sistema imune ao fígado.

É interessante o fato de que o pulmão é o principal órgão opositor à migração dos esquistossômulos. Se pudéssemos elevar o bloqueio à migração do verme – provavelmente através do recrutamento celular como àquele observado no modelo de cercárias irradiadas, poderíamos diminuir a quantidade de parasitas que chegam ao fígado. A expressão destes antígenos de *S. mansoni* em BCG recombinante poderia induzir uma resposta imune específica nos pulmões do indivíduo imunizado.

1.6 Vacina para esquistossomose baseada em BCG recombinante

A vacinação com BCG poderia induzir uma resposta imune similar à induzida pelas cercárias irradiadas. Primeiramente, através da vacinação intradérmica observamos um rápido recrutamento celular na região, composto principalmente de neutrófilos, evidenciando a imunogenicidade de ambos (ABADIE et al., 2005).

Outro ponto interessante está na utilização de uma vacina baseada num organismo vivo como carreador de antígenos heterólogos e sua migração. Em ambos os casos, os organismos vivos são mais imunogênicos e como consequência mais protetores, que organismos inativados. No caso de BCG, os bacilos vivos são transportados aos linfonodos drenantes locais (CHAMBERS et al., 1997) para então estimular a proliferação linfocítica (TURNER; DOCKRELL, 1996) ao passo que bacilos mortos por calor permanecem no sítio da imunização (CHAMBERS et al., 1997), sugerindo uma atuação voluntária do BCG para atingir os linfonodos. De acordo, os bacilos contidos nos linfonodos drenantes aparentam estar viáveis (ABADIE et al., 2005). No caso das cercárias irradiadas, como dito anteriormente, se forem expostas a altas doses de irradiação não conseguirão migrar e nem induzir proteção, sugerindo que sua migração e sensibilização dos pulmões é essencial para atingir os altos níveis de proteção (HEWITSON; HAMBLIN; MOUNTFORD, 2005).

Os estímulos imunes são semelhantes pelo estímulo do perfil tipo Th1 da resposta imune. Em modelos animais, a imunização com BCG estimula as células do baço, linfonodos e pulmões a produzir IFN- γ , IL-2 e também IL-4 (SABLE et al., 2011). São essencialmente linfócitos T CD4⁺, inclusive multifuncionais, os responsáveis pela produção destas citocinas (COOPER, 2009). Em crianças imunizadas com BCG é possível observar também a produção de citocinas associadas à resposta do tipo Th1 como IFN- γ , TNF- α e IL-2, do tipo Th2 como IL-4 e IL-5, além de citocinas regulatórias como IL-10, outras como IL-17 e quimiocinas (LALOR et al., 2010).

Em contrapartida, modelos animais imunizados com cercárias irradiadas induzem majoritariamente IFN- γ e IL-3 nos linfonodos drenantes locais (LAGRANDERIE et al., 1997b; WILSON, R. A., 1992) e lavado broncoalveolar (LAGRANDERIE et al., 1997a). Ainda, a presença de TNF- α é essencial à proteção, aparentemente, pela manutenção dos focos inflamatórios (WILSON, R. A.; COULSON, 2009).

Ao introduzir antígenos imunogênicos do parasita no BCG aproveitaríamos o estímulo imunogênico proporcionado pelo BCG a fim de levar o sistema imune a reconhecer o(s) antígeno(s) de *Schistosoma* que seriam expressos continuamente enquanto o bacilo persistisse no hospedeiro. Preferencialmente, envolveríamos antígenos localizados na superfície do *S. mansoni* e expostos ao sistema imune durante a migração dos esquistossômulos.

1.7 Antígenos de *S. mansoni* identificados no transcriptoma

Uma das correntes ideológicas no desenvolvimento de uma vacina propõe a escolha de antígenos da superfície do parasita e expostos ao sistema imune (LOUKAS; TRAN; PEARSON, 2007; WILSON, R ALAN; COULSON, 2006). No momento em que o parasita entra no hospedeiro humano – como cercária – ele começa a desenvolver um sincício que recobre toda a superfície do esquistossômulo e do verme, denominada tegumento (Figura 8). É uma camada dinâmica e multifuncional envolvida na nutrição, percepção sensorial, evasão imune, secreção e várias outras funções de igual importância, mas acima de tudo constitui a interface na interação parasita-hospedeiro (LOUKAS; TRAN; PEARSON, 2007).

Figura 8 – Representação do tegumento de *S. mansoni*. A) Visualização da secção transversal de um verme adulto macho. B) Estrutura representativa do tegumento e o corpo celular associado. C) Estrutura teórica da porção mais externa do verme, o membranocálice. Proteínas e outras moléculas produzidas no corpo celular são transportadas ao tegumento passando através das fibras musculares. O membranocálice, constitui a interface de contato entre o parasita e o hospedeiro.
Fonte: (LAGRANDERIE et al., 1993).

Em camundongos imunizados com cercárias irradiadas e desafiados, a rapidez com que ocorre o recrutamento de linfócitos T para a formação dos focos inflamatórios e contenção do parasita indica que a atuação da resposta imune celular efetora seja proveniente de memória imunológica. Logo, os antígenos do parasita devem estar acessíveis ao sistema imune em ambas as ocasiões – durante a migração da cercária irradiada e normal. Consequentemente, proteínas expostas na superfície do esquistossômulo e importantes para o metabolismo, seriam excelentes candidatos vacinais. Ainda, proteínas secretadas pelo verme

poderiam ser importantes nos mecanismos de evasão imune deste com seu hospedeiro (LOUKAS; TRAN; PEARSON, 2007).

Quadro 5 – Características dos antígenos de *S. mansoni* utilizados no projeto

ANTÍGENO ACESSO GENBANK	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO	ESTÁGIO	PROTEÇÃO (%)*
Sm29 AF029222	Tegumento	–	Sômulo e adulto	50
SmVAL-4 AY994063	–	Imunomodulação	Cercária e sômulo	–
SmVAL-5 DQ269980	–	Imunomodulação	Miracídeo	–
SmTSP-2 AF521091	Tegumento	Estabilidade /maturação do tegumento	Todos	25 – 65
SmStoLP-2 EU531730	Tegumento	–	Todos	30

*Proteção avaliada em camundongos.

1.7.1 Sm29

A Sm29 foi identificada a partir do transcriptoma de *S. mansoni*. A sequência da proteína madura possui 17 cisteínas, possivelmente formando 8 pontes dissulfeto. Possui um peptídeo sinal, três sítios de O-glicosilação e dois sítios de N-glicosilação, além de um domínio transmembrana (CARDOSO et al., 2006b).

Sua localização na camada mais externa do tegumento foi verificada por microscopia confocal (CARDOSO et al., 2006a) e por *Western blot* utilizando o tegumento de esquistossômulos e anticorpos policlonais anti-Sm29 gerados em camundongos (CARDOSO et al., 2008). Além disso, o soro de pacientes infectados reage à proteína Sm29 recombinante, produzida em *E. coli* (CARDOSO et al., 2006a), indicando sua exposição ao sistema imune do hospedeiro. Através da hibridização *in situ* em espécimes inteiros ou WISH (do inglês

“*whole amount in situ hybridization*”) os transcritos de Sm29 localizam-se majoritariamente nos corpos celulares contidos logo abaixo do tegumento (DILLON et al., 2007).

Os ensaios de imunização e desafio, utilizando 3 doses da rSm29 combinada ao adjuvante de Freund, demonstram que os animais imunizados apresentam 51% de redução da carga parasitária, 60% menor oviposição e 50% menor formação de granulomas no fígado, no modelo murino. Sugere-se que a proteção esteja associada à alta produção de anticorpos IgG1 e IgG2a, assim como altos níveis de citocinas associadas ao perfil Th1 como IFN- γ , TNF- α e IL-12 (CARDOSO et al., 2008).

Trata-se, portanto de um antígeno promissor para uso em uma vacina, pois se encontra exposto na superfície do parasita e, uma vez que o BCG induz uma resposta imune com características Th1, este antígeno expresso em BCG recombinante poderia potencializar a imunogenicidade e consequentemente, aumentar a proteção.

1.7.2 SmVAL-4

Pertence a grande família das *S. mansoni venom-allergen-like proteins*, SmVALs, proteínas semelhantes a alérgenos com possíveis propriedades imunomodulatórias (CHALMERS et al., 2008).

É uma proteína presente no estágio de cercária e há evidências de ser uma proteína secretada no estágio de esquistossômulo, assim como outras SmVALs do grupo 1. Suas propriedades imunomodulatórias são evidenciadas no modelo murino, onde observa-se, em um modelo de asma adaptado, que animais imunizados com a proteína recombinante e desafiados via intranasal, promovem um recrutamento celular mais intenso – composto principalmente por macrófagos e eosinófilos (FARIAS et al., 2012).

Suas propriedades imunomodulatórias poderiam contribuir nas interações parasita-hospedeiro ou no próprio processo de migração – direcionando o sistema imune a uma resposta não protetora. Se pudéssemos gerar anticorpos neutralizantes, como previamente observado (KREMER et al., 1996), inibiríamos esta desorientação às proteínas importantes do parasita.

1.7.3 SmVAL-5

A *smval-5* possui 813 nucleotídeos em seu RNA mensageiro processado. Este possui transcrição aumentada nas fases de ovo, miracídeo e esporocisto, portanto fases relacionadas

ao hospedeiro intermediário. A *smval-5* possui uma sequência sinal de exportação o que indica que seja secretada (Chalmers, McArdle et al. 2008).

A SmVAL-5, assim como a SmVAL-4, pertence a grande família das SmVALs (CHALMERS et al., 2008). De fato, não somente a SmVAL-4, mas outras proteínas desta família – expressas sob a forma de proteína recombinante – apresentam propriedades imunomodulatórias (FARIAS et al., 2012).

Sobretudo, ensaios realizados em nossos laboratórios demonstram que a SmVAL-5, como vacina de DNA, possui um efeito protetor contra o desafio de cercárias.

1.7.4 *SmTSP-2*

A proteína SmTSP-2 possui quatro domínios transmembrana e dois *loops* extracelulares preditos, um menor e outro maior (Figura 9). Enquanto os domínios transmembrana proporcionariam estabilidade, os loops extracelulares indicam a capacidade de interação com outras proteínas (LOUKAS; TRAN; PEARSON, 2007). A SmTSP-2 ou tetraspanina-D é uma proteína localizada na camada mais externa do tegumento de vermes adultos machos e fêmeas, ou seja, no membranocálix. Ortólogos de mamíferos indicam que esteja relacionada às interações intercelulares e também na manutenção da integridade da membrana.

O domínio descrito como o loop extracelular maior da SmTSP-2 expresso sob a forma de proteína recombinante em *E. coli* e fusionado à tioredoxina, proporciona 61% e 67% de proteção contra desafio e redução da carga de ovos no fígado, respectivamente (TRAN et al., 2006).

Ainda, ao inibir a transcrição do RNA mensageiro da *smtsp-2* por RNA de interferência (RNAi), profundas alterações tegumentares são observadas e este torna-se mais delgado e vacuolizado. A hipótese é que o silenciamento da tetraspanina-D modifique sua interação com as integrinas, que são importantes na integridade do tegumento (TRAN et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste projeto foi desenvolver uma vacina para esquistossomose baseada em BCG recombinante, através da expressão de antígenos de *S. mansoni* identificados no transcriptoma.

2.2 Objetivos específicos

- Construir diversos vetores de expressão micobacterianos para a expressão dos antígenos propostos: SmTSP-2, Sm29, SmVAL-4, SmVAL-5 e SmStoLP-2;
- Obter cepas de BCG recombinante (rBCG) expressando os antígenos propostos;
- Avaliar a resposta imune de camundongos imunizados com estas cepas de rBCG;
- Investigar novas formas de expressão de antígenos em rBCG ao:
 - Criar uma biblioteca de plasmídeos com promotores mutagenizados e caracterizar sua força de expressão em *M. smegmatis* recombinante;
 - Verificar a expressão em rBCG;
 - Selecionar alguns promotores mutagenizados para investigar a expressão dos antígenos com códons otimizados de SmTSP-2 e Sm29.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

Para a realização das clonagens, alíquotas da cepa *E. coli* DH5 α (Invitrogen) quimiocompetentes e mantidas a -80 °C foram utilizadas. A seleção de transformantes de *E. coli* DH5 α foi realizada em meio LB (do inglês “*lysogeny broth*”) contendo 20 μ g/mL de canamicina (Sigma) – LB-kan, após incubação por 16 h a 37 °C.

As cepas de micobactéria utilizadas neste estudo foram três: *M. smegmatis* MC² 155, *M. bovis* BCG cepa Pasteur e *M. bovis* BCG cepa Moreau. As bactérias foram mantidas em alíquotas a -80 °C. A cepa BCG Pasteur foi utilizada para analisar a expressão de eGFP e, posteriormente para analisar a expressão dos antígenos induzida pelos vetores pJK. Para todas as outras transformações foi utilizada a cepa Moreau.

Os cultivos líquidos de *M. smegmatis* foram realizados em meio Middlebrook 7H9 (Difco, Oxford, UK) contendo glicerol 0,5% (Sigma) e Tween 80 0,05% (Inlab) – MB7H9 e os cultivos em meio sólido de *M. smegmatis* foram realizados em placas de Middlebrook 7H10 (Difco) contendo glicerol 0,5% – MB7H10 e com incubação por até 5 dias a 37 °C. Quando necessário para seleção de transformantes, 20 μ g/mL de canamicina foram adicionados ao meio (MB7H10-kan).

Os cultivos líquidos de *M. bovis* BCG foram realizados em meio MB7H9 suplementado com 10% (v/v) de meio de enriquecimento OADC (0,25 mg de ácido oleico, 250 mg de albumina, 100 mg de dextrose, 0,02 mg de catalase e 42,5 mg de cloreto de sódio) – MB7H9-OADC e os cultivos sólidos realizados em placas de MB7H10 suplementados com OADC e com incubação por até 3 semanas a 37 °C e 5% de CO₂. Quando necessário para seleção de transformantes, 20 μ g/mL de canamicina foram adicionados ao meio (MB7H9-OADC-kan).

3.2 Preparação de bactérias competentes e transformação

3.2.1 *E. coli* DH5 α quimiocompetente

A preparação de *E. coli* DH5 α quimiocompetente foi realizada conforme descrito por Sambrook. Uma alíquota da cepa *E. coli* DH5 α foi inoculada em 100 mL meio LB sob agitação a 250 RPM em shaker Gyromax 737R (Amerex, Lafayette, CA, EUA) por 37 °C até

atingir D.O.₆₀₀ de 0,4 – 0,6 quando o cultivo foi recuperado, deixado sob gelo por 15 min e, posteriormente, centrifugado a 3200 g a 4 °C por 10 min. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular lavado com 50 mL de solução gelada estéril de 0,1 M CaCl₂. Após 15 min sob gelo, a solução com as bactérias foi centrifugada novamente nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensionado com 2 mL da mesma solução gelada de 0,1 M CaCl₂ contendo glicerol 15% e aliquoteado em 50 µL. As alíquotas foram estocadas a -80 °C até seu uso.

A alíquota de *E. coli* DH5α foi retirada do estoque a -80 °C e descongelada por 15 min sob gelo. Entre 10 – 100 ng de DNA plasmidial ou 50 – 200 ng do produto de ligação foram misturados à alíquota que foi deixada sob gelo por outros 30 min. Após este período procedeu-se o choque térmico à bactéria incubando a alíquota por 2 min a 42 °C seguido de 3 min sob gelo. Após o choque térmico, 450 µL de meio LB foram adicionados e pré-incubados por 60 min a 37 °C sob agitação a 250 RPM. Em seguida, a alíquota foi semeada em placas de LB-kan que foram incubadas por 16 h a 37 °C.

3.2.2 *M. smegmatis* MC² 155 eletrocompetente

Para geração de *M. smegmatis* MC² 155 eletrocompetente uma única colônia foi inoculada em 5 mL de MB7H9 sob agitação a 250 RPM por 37 °C por até 4 dias, gerando assim o pré-inóculo, que foi utilizado para inocular 50 mL de MB7H9 mantido sob as mesmas condições até chegar a fase exponencial D.O.₆₀₀ 0,6 – 0,8. O cultivo foi mantido por 90 min sob gelo e centrifugado a 3200 g a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado duas vezes com 50 mL de glicerol 10% gelado estéril, removendo o sobrenadante por centrifugação nas mesmas condições anteriores. Ao final, o sedimento celular foi ressuspensionado em 1 mL de glicerol 10% e aliquoteado em 100 µL. As alíquotas foram estocadas a -80 °C até seu uso.

Para a transformação, 100-300 ng de cada plasmídeo construído foi misturado à alíquota em uma cuveta de eletroporação de 2 mm (BTX Harvard, Holliston, MA, EUA) e submetida a eletroporação a 2,5 kV, 25 µF e 1000 Ω em eletroporador de pulsação Gene Pulser II (BioRad, Hercules, CA, UK). A eficiência da eletroporação foi monitorada observando a constante de tempo indicada pelo aparelho. Usualmente entre 19 – 21 ms para *M. smegmatis*.

Após o pulso, a cuveta foi incubada por 10 min sob gelo e, em seguida, as células ressuspensionadas em 2 mL de MB7H9 e pré-incubadas a 37 °C por 2 h. Este inóculo foi

distribuído em placas MB7H10-kan incubadas por até uma semana a 37 °C até o aparecimento de colônias visíveis.

3.2.3 *M. bovis* BCG eletrocompetente

Para geração de *M. bovis* eletrocompetente uma única colônia foi inoculada em 2 mL de MB7H9-OADC e mantido por até 2 semanas a 37 °C e 5% de CO₂, que foi utilizado para inocular 50 mL de MB7H9-OADC mantido sob as mesmas condições até chegar a fase exponencial D.O.₆₀₀ 0,6 – 0,8. O cultivo foi centrifugado a 3200 g a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado por três vezes com 50 mL, 10 mL e 5 mL de glicerol 10% gelado estéril, removendo o sobrenadante por centrifugação nas mesmas condições anteriores. Ao final, o sedimento celular foi ressuspensionado em 1 mL de glicerol 10% e alíquotado em 50 µL. As alíquotas foram estocadas a -80 °C até seu uso.

Para a transformação de micobactéria, 100-300 ng de cada plasmídeo construído foi misturado a uma alíquota de bactéria competente em uma cuveta de eletroporação de 2 mm (BTX Harvard) e submetida a eletroporação a 2,5 kV, 25 µF e 1000 Ω em eletroporador de pulsação Gene Pulser II (BioRad). A eficiência da eletroporação foi monitorada observando a constante de tempo, usualmente entre 17 – 19 ms para BCG.

Após o pulso, a cuveta foi devolvida ao gelo por 10 min e as células ressuspensionadas em 1 mL de MB7H9-OADC e pré-incubadas a 37 °C por 16 h. O inóculo foi distribuído em placas MB7H10-OADC-kan e incubadas por 2-3 semanas a 37 °C e 5% de CO₂ até o aparecimento de colônias visíveis.

3.3 Obtenção dos fragmentos gênicos

As sequências do cDNA de *smtsp-2*, *smstolp-2*, *sm29*, *smval-5* e *smval-4* foram amplificadas de plasmídeos previamente construídos para a expressão das proteínas recombinantes em *E. coli* e *Pichia pastoris*.

O plasmídeo pET-21 (Invitrogen) contendo a sequência parcial de *sm29* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os plasmídeos pDEST-17 e pPICZ-alfa (Invitrogen) e o plasmídeo pTARGET (Promega) contendo as sequências de *smstolp-2*, *smval-4ppco* e *smval-5* foram construídos previamente em nossos laboratórios e gentilmente cedidos pelo Dr. Leonardo Paiva Farias. O plasmídeo pET-41 (Invitrogen) contendo a

sequência parcial de *smtsp-2* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Alex Loukas, do Helminth Biology Laboratory do Queensland Institute of Medical Research, Austrália.

3.4 Construção dos vetores de expressão

3.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados de forma a manter a fase de leitura com a sequência sinal da β -lactamase ou com a β -lactamase inteira na produção das proteínas de fusão.

A sequência de *sm29* foi amplificada sem sua sequência sinal e domínio transmembrana preditos. A sequência de *smval-4* foi amplificada a partir do gene sintético com códon otimizado para *P. pastoris* disponível no laboratório. A *smval-4* possui uma sequência sinal e o fragmento amplificado excluí essa sequência. A sequência de *smval-5* foi amplificada sem sua sequência sinal predita e sem a porção que codificaria a região C-terminal da proteína. A *smtsp-2* foi amplificada somente no fragmento que representa seu loop extracelular maior (Glu107-His184). A *smstolp-2* foi amplificada na totalidade de seu cDNA.

Através de reação em cadeia da polimerase (PCR): em um volume final de 50 μ L foram adicionados 2 U de *Taq* DNA polimerase (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo direto e reverso, 2-3 mM de $MgCl_2$, 300 μ M de dNTPs (Promega, Fitchburg, WI, EUA) juntamente com 100-200 ng de DNA plasmidial contendo os genes de interesse. Foram conduzidos 30 ciclos de amplificação (denaturação a 95 °C por 1 min, anelamento dos oligonucleotídeos a 52-58 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 2 min) e ao final 10 min a 72 °C para extensão final, finalizando a reação a 4 °C em termociclador PTC-100 (MJ Research, Ramsey, MN, EUA). Ao final da reação o produto de PCR foi observado em gel de agarose a 1% diluído em tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA pH 8.3).

As bandas do tamanho esperado foram excisadas do gel e purificadas no kit GFX PCR DNA and Gel Band purification (GE HealthCare, Waukesha, WI, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

3.4.2 Digestão e ligação

O DNA dos fragmentos purificados foi digerido com as enzimas de restrição adequadas a 37 °C por 1 h de acordo com as recomendações do fabricante (Kpn I e Not I para digestão dos fragmentos a ser inseridos em pLA71 e pLA73; BamH I e Kpn I para digestão dos fragmentos a ser inseridos em pMIP12) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). Os plasmídeos pLA71, pLA73 e pMIP12 (Figura 10) também foram digeridos nas mesmas condições e submetidos à eletroforese para separação dos fragmentos. Os fragmentos referentes aos vetores linearizados foram excisados do gel, purificados e digeridos da mesma maneira que o produto de PCR.

Após a digestão do produto de PCR e dos vetores linearizados, os fragmentos foram novamente purificados e quantificados em um aparelho NanoDrop 1000 (Thermo). Os fragmentos foram unidos por uma reação de ligação utilizando T4 DNA Ligase (Promega) e seu tampão pela incubação a 4 °C por 16 h em volume final de 20 µL, além de vetor e inserto na razão de 1:3 ou 1:5 pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto}}{\text{tamanho do vetor}} \times \text{razão inserto:vetor} = \text{ng de inserto}$$

Um quarto do produto de ligação (5 µL) foi utilizado para transformar alíquotas de bactérias DH5α competentes por choque térmico.

3.4.3 Recuperação plasmidial

Após a transformação de *E. coli* DH5α, 2-3 colônias transformantes foram aleatoriamente escolhidas e inoculadas em 3 mL de meio líquido LB-kan e incubadas por 16 h a 37 °C. No dia seguinte, os cultivos foram centrifugados a 3200 g, a 4 °C por 10 min em centrífuga Eppendorf 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e o plasmídeo extraído e purificado através do kit plasmidPrep Mini Spin (GE) seguindo orientações do fabricante. A integridade das sequências e a correta inserção nos vetores foram confirmadas por sequenciamento automático.

Figura 10 – Representação esquemática dos vetores de expressão utilizados. Os vetores possuem o gene de resistência a canamicina (Tn903), origem de replicação em micobactéria de *M. fortuitum* (OriM), origem de replicação em *E. coli* de pUC19 (OriC) e o promotor da β -lactamase de *M. fortuitum* mutado, pBlaF*. Para clonagem em pLA71 e pLA73 o gene de interesse é inserido no lugar de *phoA*, nos sítios Kpn I e Not I. Em pLA71 sequência é inserida em fusão à sequência sinal e em pLA73 em fusão à sequência completa da β -lactamase. Em pMIP12, sequência é inserida após uma sequência Shine-Dalgarno de micobactéria (Mega SD), nos sítios BamH I e Pst I.

3.4.4 Otimização de códons

Os genes sintéticos das sequências de *smtsp-2*, *smval-5* e *sm29* foram desenhados com base nos dados de sequências nucleotídicas expressas (CDS's do inglês, “coding sequences”) de *Mycobacterium bovis* BCG cepa Pasteur 1173P2 disponível pela *Codon Usage Database* (NAKAMURA; GOJOBORI; IKEMURA) e otimizados pela empresa DNA 2.0 (San Francisco, CA, USA). Assim obtivemos as sequências otimizadas, denominadas *smtsp-2opt*, *smval-5opt* e *sm29opt*, respectivamente, clonadas pela empresa no plasmídeo pJ202, por sua vez adsorvidas em papel de filtro. Os plasmídeos foram eluídos do papeis de filtro adicionando 50 μ L de água milliQ aos papeis depositados ao fundo de cada microtubo de 1,5 mL. Os DNAs plasmídiais eluídos foram quantificado pelo aparelho Nanodrop 1000. Cerca de 100-200 ng foram utilizados como amostra para amplificação por PCR das sequências otimizadas, e seguindo a mesma metodologia empregada anteriormente, clonadas nos vetores de expressão pLA71 e pMIP12.

Após a obtenção dos promotores pL5 mutagenizados apresentando diferentes “forças de expressão” de *egfp*, amplificou-se as sequências gênicas de *smtsp-2opt*, *smval-5opt* e *sm29opt*, utilizando novos oligonucleotídeos diretos e reversos, alterando-se apenas os sítios de restrição para Nde I e Pvu II (New England Biolabs), e as sequências foram clonadas nos vetores pJK. Cerca de 1 µg de cada um dos vetores pJK-C1, pJK-B7 e pJK-A2 foram digeridos com as enzimas de restrição Nde I e Pvu II, conforme as orientações do fabricante e separados em gel de agarose 1% para remover a sequência de *egfp*. Os vetores linearizados foram recuperados pela excisão da banda correspondente e seguido o protocolo do kit GFX PCR DNA and Gel Band purification (GE). Os produtos de PCR das sequências de *smtsp-2opt*, *smval-5opt* e *sm29opt* também foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição Nde I e Pvu II, gerando assim extremidades correspondentes para a ligação aos vetores pJK. A ligação, transformação e recuperação dos vetores construídos ocorreu da mesma maneira como procedido anteriormente para a geração dos vetores pLA71, pLA73 e pMIP12 contendo os genes de *Schistosoma*, descrito em “Item 0

Construção dos vetores de expressão”. A correta inserção dos fragmentos nos vetores correspondentes foram confirmadas por sequenciamento automático.

3.5 Animais

Camundongos C57BL/6 fêmeas de 5 a 7 semanas de idade, obtidos do biotério central do Instituto Butantan foram utilizados para a avaliação da resposta imune e proteção das cepas rBCG::pLA71Sto e rBCG::pMIPSto.

Camundongos C57BL/6 fêmeas de 5 a 7 semanas de idade, obtidos do biotério de criação da Faculdade de Medicina (FMUSP) foram utilizados na avaliação da resposta imune da cepa rBCG-Sm29.

Camundongos BALB/c fêmeas de 5 a 7 semanas de idade, obtidos do biotério de criação da Faculdade de Medicina (FMUSP) foram utilizados na produção de anticorpos específicos.

Todos os animais foram mantidos no biotério de experimentação animal do Laboratório de Biotecnologia Molecular IV segundo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUA/IB) sob o protocolo 594/09.

3.6 Produção dos anticorpos

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c entre 5 – 7 semanas de idade foram utilizados para a produção de anticorpos policlonais contra as respectivas proteínas recombinantes. Para isso, grupos de 5 animais foram imunizados por três vezes pela via subcutânea no dorso em intervalos de 15 dias com 25 µg de proteína recombinante associado ao adjuvante hidróxido de alumínio em proporção de 1:10 (p/p) ou ao adjuvante Titermax (CytRx Corporation, Los Angeles, CA, EUA), segundo instruções do fabricante. A exsanguinação foi realizada por punção cardíaca 15 dias após a última dose e o sangue coletado acondicionado a 4 °C por 16 h. Após este período, o coágulo formado foi descartado e o sangue centrifugado a 800 g a 4 °C por 10 min. O soro foi recuperado e titulado para determinar os níveis de anticorpos específicos IgG para cada proteína, por ELISA (Item 3.9.1 Determinação de anticorpos IgG por ELISA).

3.7 Geração de *M. smegmatis* e BCG recombinante

Entre 2-5 colônias transformantes de *M. smegmatis* para cada construção plasmidial foram inoculadas em 5 mL de MB7H9-kan e incubadas a 37 °C por até 4 dias, gerando assim o pré-inóculo, que foi utilizado para inocular 50 mL de MB7H9 mantido sob as mesmas condições até a fase exponencial D.O.₆₀₀ 0,8 – 1,0. Metade do cultivo foi utilizado para analisar a expressão dos antígenos por *Western blot* e a outra metade utilizada para as preparações vacinais.

Entre 2-5 colônias transformantes de BCG para cada construção plasmidial foram inoculadas em 2 mL de MB7H9-OADC-kan e incubadas por uma semana a 37 °C e 5% CO₂, gerando assim o pré-inóculo, que foi utilizado para inocular 50 mL de MB7H9-OADC-kan mantido sob as mesmas condições por até duas semanas atingindo a fase exponencial D.O.₆₀₀ 0,8 – 1,0. Metade do cultivo foi utilizado para analisar a expressão dos antígenos por *Western blot* e a outra metade utilizada para as preparações vacinais.

3.7.1 Análise da expressão por *Western blot*

Metade do cultivo total, cerca de 25 mL, foram separados para análise da expressão. Primeiro procedeu-se a centrifugação a 3200 g por 10 min. O sedimento celular foi lavado duas vezes com 20 mL de PBS, e ressuspenso em 500-1000 µl de PBS contendo inibidor de

proteases PIC (do inglês, “*protease inhibitor cocktail*”) (2 mM AEBSF [4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride], 130 μ M bestatin, 1 mM EDTA, 14 μ M E-64, 1 μ M leupeptin e 0,3 μ M aprotinin) (Sigma). A lise das células foi conduzida por sonicação sob gelo numa amplitude de 60 Hz (Ultrasonic Processor GE 100) por 5 min utilizando pulsos de 1 s. O extrato proteico foi centrifugado a 10,000 g por 30 min a 4 °C para separação das frações, pellet e sobrenadante. O pellet do produto sonicado concentra células não rompidas e grandes fragmentos celulares além de estar enriquecido com fragmentos da parede celular. O sobrenadante, por sua vez, concentra mais produtos intracelulares e hidrossolúveis liberados pela lise. A concentração das proteínas totais foi determinada na fração de sobrenadante através do kit DC Bio-Rad Protein Assay (BioRad), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Cerca de 30 μ g de extrato proteico total de cada amostra foram aplicados em minigel de poliacrilamida 12 – 15% na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). O marcador de massa molecular Low Molecular Weight (GE) ou Prestained Molecular Weight (Thermo) foram usados como padrão. A eletroforese foi conduzida em um aparelho Mini-PROTEAN Tetra Cell a temperatura ambiente a 120 volts até o tampão marcador atingir o final do gel.

Em seguida, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana Hybond™ de nitrocelulose ou PVDF Amersham (GE), utilizando o sistema de transferência semi-seco Panther Semidry Electrobloetter HEP-1 (Thermo). Para isso, os minigéis de SDS-PAGE contendo os extratos proteicos foram colados às membranas previamente ativadas se necessário com etanol ou metanol, imersos por 15 min em tampão de transferência (250 mM de Tris pH 8,3, 129 mM de glicina e metanol 20%) e colocados entre 5 folhas de papel de filtro 3MM Whatman (GE), também embebidas no tampão. O conjunto foi colocado entre as duas placas do sistema de transferência e submetido a uma corrente de 1-3 mA/cm² por 90 min a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram imersas em uma solução bloqueadora de PBS contendo 5% de leite em pó desnatado e incubadas a 4 °C por 16 h. No dia seguinte, as membranas foram incubadas por 2-4 h a temperatura ambiente com o soro contendo anticorpos anti-proteínas recombinantes, na diluição de 1:1000 em PBS contendo 5% de leite, sob leve agitação. Após este período as membranas foram lavadas três vezes por 10 min, sob leve agitação, com PBS e 0,05% de Tween 20. Depois, as membranas foram incubadas por 1 h nas mesmas condições em PBS contendo 5% leite e anti-IgG conjugado a Horseradish Peroxidase e adsorvido contra proteínas do soro de humanos (Sigma) em diluição de 1:2000 e novamente lavadas três vezes com PBS e 0,05% de Tween 20. A revelação foi

realizada por quimiluminescência através do kit ECL Amersham (GE) pela exposição ao filme de raio-X ou captura do sinal quimioluminescente pelo fotodocumentador LAS 4000 (GE).

3.7.2 *Preparo das vacinas*

As cepas de BCG recombinantes cujos extratos proteicos demonstraram por *Western blot*, expressar os antígenos de *S. mansoni* foram preparadas para os ensaios de vacinação e avaliação da resposta imune e proteção.

A outra metade do cultivo, ou seja 25 mL, foi centrifugada e lavada por 3 vezes com 20 mL de H₂O Milli-Q gelada estéril e centrifugada a 3200 g por 10 min. Ao final, o sedimento celular foi ressuscitado em 1 mL de glicerol 10% gelado estéril e as alíquotas de 100 µL estocadas a -80 °C.

A viabilidade das bactérias foi determinada através de diluições seriadas de uma das alíquotas. Uma alíquota da preparação vacinal em glicerol foi descongelada sob gelo por 10 min e diluições seriadas em PBS foram plaqueadas em MB7H10-OADC-kan e as placas incubadas a 37 °C e 5% CO₂ até o aparecimento de colônias visíveis. A viabilidade foi determinada através da multiplicação da diluição pelo número de CFUs encontradas.

3.8 *Avaliação da proteção pela redução da carga parasitária*

Camundongos fêmeas de 5 – 7 semanas de idade da linhagem C57BL/6 foram usados para analisar a resposta imune e proteção induzida pelas vacinas de BCG recombinante (Figura 11). Grupos de 10 camundongos foram imunizadas via subcutânea duas vezes em intervalos de 30 dias com 10⁶ CFU de rBCG::pLA71Sto, rBCG::pMIPSto, BCG ou salina, totalizando quatro grupos, e desafiados 30 dias após a 2^a dose. No dia anterior ao desafio, os animais foram tricotomizados na região do abdômen com o aparelho Pro-Cord Trimmer (Oster). No outro dia, os animais foram anestesiados com xilasina (10 mg/kg) e cetamina (90 mg/kg) injetados via intraperitonal e colocados em canaletas de acrílico com o abdômen para cima. Ao abdômen exposto, um anel de metal foi preso com fita adesiva e colocado 1 mL de água contendo cerca de 100 cercárias, por 30 min. Os animais foram eutanasiados após 45 dias pela injeção intraperitonal de uretano (150 mg/mL) e a perfusão da artéria aorta para recuperação dos vermes foi realizada com solução de salina heparinizada (500 U/L).

A determinação de proteção foi estimada pela determinação do número de vermes adultos recuperados nos grupos imunizados em relação ao grupo salina. Abaixo está a representação esquemática dos procedimentos realizados ao longo deste experimento. A determinação estatística foi averiguada por ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Figura 11 – Representação esquemática do ensaio de avaliação da proteção induzida pelo rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto. Camundongos C57BL/6 foram imunizados duas vezes com 10^6 CFU de rBCG (rBCG::pMIPSto ou rBCG::pLA71Sto), além de controles salina e BCG. O desafio foi realizado expondo a barriga dos animais a 100 cercárias por 30 min e após 45 dias determinou-se a quantidade de vermes adultos recuperados pela perfusão da artéria aorta.

3.8.1 Contagem de ovos

A contagem de ovos do parasita nos fígados foi realizada retirando-se o lobo caudado e lobo quadrado dos animais desafiados, pesando-os e incubando-os sob agitação em 5 mL de solução contendo 5% KOH a 37 °C por 16 h. No dia seguinte, as misturas foram homogenizadas e procedeu-se a contagem de ovos em duplicata de 100 μ L em placas de 48 poços em microscópio invertido. A contagem foi determinada por grupo experimental após normalização entre quantidade de ovos por peso de fígado. A determinação estatística foi averiguada por ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A análise de “outliers” foi determinada pelo Teste de Grubbs.

3.9 Avaliação da resposta imune

3.9.1 Determinação de anticorpos IgG por ELISA

Para análise da resposta imune humoral induzida pela imunização, realizou-se a sangria retro-orbital dos animais 3 dias antes do desafio. O sangue foi centrifugado e os soros separados e utilizados para os ensaios de ELISA. Foram utilizados dois protocolos de imunização. O 1º foi realizado com rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto juntamente com os controles BCG selvagem e salina, conforme o esquema da figura abaixo (Figura 12):

Figura 12 – Representação esquemática do ensaio de avaliação da resposta imune induzida pelo rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto. Camundongos C57BL/6 foram imunizados duas vezes com 10^6 CFU de rBCG (rBCG::pMIPSto ou rBCG::pLA71Sto), além de controles salina e BCG. No 57º dia o sangue foi coletado e determinou-se a concentração de anticorpos anti-SmStoLP-2 no soro. Depois, os animais foram sacrificados para coleta do baço e avaliação da resposta imune celular induzida.

No 2º ensaio, onde avaliou-se a resposta imune induzida pela imunização com a cepa rBCG-Sm29 um outro esquema de imunização foi adotado (Figura 13):

- Grupo 1: Salina;
- Grupo 2: BCG (dose única com 10^6 CFU);
- Grupo 3: rBCG-Sm29 (dose única com 10^6 CFU);
- Grupo 4: Grupo 5: rSm29 (25 µg + hidróxido de alumínio, dose única).

Figura 13 – Representação esquemática do ensaio de avaliação da resposta imune induzida pelo rBCG-Sm29. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com salina (grupo 1), 10^6 CFU de BCG (grupo 2), 10^6 CFU de rBCG-Sm29 (grupo 3) ou a proteína recombinante (rSm29 25 μ g + hidróxido de alumínio) e a resposta imune induzida foi analisada após 30 dias.

Para realização do ELISA, foram utilizadas placas Maxisorb de 96 poços (Nunc International, Rochester NY, EUA) sensibilizadas com as proteínas recombinantes previamente purificadas de *E. coli* (100 μ L/poço a 5 μ g/mL em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6) pela incubação a 4 °C por 16 h. Ainda, uma curva de concentração de proteína IgG foi utilizada em diluições seriadas.

No dia seguinte, as placas foram lavadas por três vezes com 300 μ L de PBS e Tween 20 0,05% (PBS-T20) por poço e bloqueadas por 30 min com PBS contendo 5% de leite em pó desnatado Molico. Após nova lavagem de três vezes com PBS-T20, diluições seriadas dos soros dos animais foram incubadas a 37 °C por uma 1 h. Uma nova lavagem de três vezes com PBS-T20 e, incubação do anticorpo secundário na diluição de 1:10000 (anti-IgG de camundongo feito em cabra) (Southern Biotech, Birmingham, AL, EUA) a 37 °C por uma 1 h. Nova lavagem de três vezes com PBS-T20 e, incubação com o anticorpo terciário na diluição de 1:30000 (anti-IgG de cabra feito em coelho ligado à peroxidase) (Southern Biotech) a 37 °C por uma 1 h. Após a lavagem final de seis vezes com PBS-T20 os anticorpos específicos foram determinados pela adição de OPD (0,05% *o*-phenylenediamine) em tampão citrato pH 5.0 contendo H_2O_2 0,01%. Após o desenvolvimento de cor característica, entre 10 – 20 min, a reação foi interrompida adicionando 4 N de H_2SO_4 e a absorbância A_{492} determinada em um leitor de ELISA Labsystem (Thermo). A determinação estatística foi averiguada por ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.9.2 Determinação de citocinas por CBA

Para análise da resposta imune celular *in vitro* induzida pela imunização com rBCG-Sm29, o baço de 5 animais de cada grupo foi removido, macerado e as células ressuspendidas em RPMI-1640 (Gibco, CA, EUA). Depois de lavadas e tratadas com 1 mL de água destilada por 10 s para remoção de eritrócitos, as células foram ressuspendidas em 10 mL de RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, São Paulo SP, Brasil), 100 U/mL de penicilina G e 100 U/mL de sulfato de streptomicina e 250 ng/mL de polimixina B e cultivadas (2×10^6 /mL) em placas de cultura de tecidos de 48 poços (Corning Glass Works, Corning, NY) em 500 μ L de volume por poço. O estímulo da cultura de esplenócitos deu-se com PDS (5 μ g/mL), a proteína recombinante rSm29 (20 μ g/mL), concanavalina A (5 μ g/mL, Sigma) como controle positivo para reatividade celular ou salina como controle negativo. As culturas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 h e o sobrenadante das culturas coletado para determinar a secreção de citocinas por CBA.

A presença de citocinas foi avaliada por Kit CBA Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences). Um pool contendo as beads presentes no kit com diferentes intensidades do fluorocromo APC e conjugadas com anticorpos específicos para as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-10 foi preparado utilizando-se 5 μ L de cada bead/amostra. Foram adicionados 25 μ L do pool de beads/poço em placa de 96 poços de fundo V. Em seguida, adicionou-se 25 μ L de cada amostra de sobrenadante e 25 μ L do anticorpo de detecção conjugado ao fluorocromo PE. Após agitação de 5 minutos, em shaker horizontal, a placa foi incubada por 2 h em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 200 g por 10 min e lavadas com 100 μ L do tampão de lavagem do kit. Após nova centrifugação as amostras foram ressuspendidas em 100 μ L do mesmo tampão e a leitura realizada ao citômetro de fluxo FACS Canto II (BD) adquirindo 2100 eventos (o equivalente a aproximadamente 300 eventos por citocina). O pool de proteínas recombinantes de cada citocina provido pelo Kit foi utilizado como curva padrão. Para análise dos resultados foi utilizado o Software FCAP ArrayTM 3.0. A determinação estatística foi averiguada por ANOVA de duas vias seguida do Teste de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.9.3 Determinação de células produtoras de citocinas por ELISPOT

Para a imunização com rBCG expressando estomatina, determinou-se quantitativamente os esplenócitos capazes de produzir as citocinas IFN- γ e IL-4 quando

estimulados com o antígeno rStoLP-2 por ELISPOT. Os anticorpos de captura (anti-IFN- γ e anti-IL-4) foram imobilizados em placas de 96 poços (Immunoplates Maxisorp) em 100 μ L de PBS pela incubação a 4 °C por 16 h. No dia seguinte fez-se o bloqueio da placa (RPMI, 10% SFB, 1% penicilina, 1% streptomicina e 1% L-glutamina) a temperatura ambiente por 2 h. Os esplenócitos de dois camundongos de cada grupo foram coletados e incubados (2×10^7 /mL para IFN γ e IL-4) em triplicata a 37 °C e 5% CO₂ por 20 h. No dia seguinte, lavou-se com água deionizada duas vezes e PBS e 0,05% de Tween 20 por três vezes e incubou-se o anticorpo de detecção biotinilados, anti-IFN- γ ou anti-IL-4 (Pharmigen, San Diego CA, EUA) por 2 h. Após lavar a placa por três vezes com PBS e 0,05% de Tween 20, incubou-se a estreptavidina (1:100, em 100 μ L de PBS 10% SFB) por 1 h. Após este período, lavou-se a placa novamente em PBS e 0,05% de Tween 20 e adicionou-se o substrato final 5BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato), monitorando a visualização dos spots e parando a reação em determinado momento lavando-as com água deionizada. Em seguida, os spots foram contados no microscópio estereoscópico. A determinação estatística foi averiguada por ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.10 Criação da biblioteca de plasmídeos pJK

A dificuldade de obter expressão dos antígenos de *Schistosoma* em BCG – até mesmo com códon otimizado para micobactéria – nos levou a propor a modificação do promotor pL5 oriundo do micobacteriófago L5 e ativo em micobactéria, através de *error-prone* PCR, visando a obtenção de vetores com diferentes níveis de expressão, medido através do marcador fluorescente eGFP.

O plasmídeo pJH152 utilizado no projeto foi gentilmente cedido pelo Dr. Stewart T. Cole (École Polytechnique Fédérale de Lausanne – EPFL, Lausanne, Suíça).

3.10.1 Geração de pJH-gfp

O cassette de expressão (promotor pL5 e a sequência nucleotídica de *egfp* (do inglês “*enhanced green fluorescent protein*”)) foi amplificado por PCR em uma reação de 50 μ L, utilizando-se 2 U da enzima *GoTaq* DNA polimerase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante juntamente com 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo direto cassette_forward 5'-TAGGGTACCTCTAGAGGAAACAGCTATGACCAT-3' e reverso cassette_reverse 5'-

TAGATCGATCAGCTGTTACTTGTACAGCTCGT-3'. O produto de PCR previamente purificado (1-3 µg) foi digerido com as enzimas de restrição Kpn I e Pvu II (New England Biolabs). O plasmídeo pJH152 (1-3 µg) foi digerido com as mesmas enzimas de restrição para liberar assim o cassette de expressão original contendo o promotor do antígeno alfa de *M. tuberculosis* (YU et al., 2006). Após a purificação do vetor a partir do gel de agarose, a ligação dos fragmentos de inserto e vetor ocorreu como descrito previamente (Item 3.4.2 Digestão e ligação). Assim, gerou-se pJH-gfp (Figura 14). A inserção correta do novo cassette de expressão foi confirmada por sequenciamento automático.

Figura 14 – Desenho esquemático do plasmídeo pJH-gfp. A partir do plasmídeo pJH152, gerou-se pJH-gfp. O plasmídeo contém o cassette de expressão (promotor pL5 e o gene *egfp*), o marcador de resistência à canamicina (Tn903), terminador transcricional após *egfp*, origem de replicação em *E. coli* OriC e em micobactéria OriM.

purinas e pirimidinas, denominados dPTP e 8-oxo-dGTP (Jena Bioscience, Jena, Alemanha), capazes de gerar transversões (A→C, T→G) e transições (A→G, T→C, G→A, C→T), respectivamente (ZACCOLO et al., 1996). À reação de 20 µL foram adicionados quantidades equimolares dos quatro dNTPs naturais (400 µM) e 25 µM de 8-oxo-dGTP e 5 µM de dPTP, 1,5 mM de solução MgCl², 4 µL do tampão de PCR 5x própria da enzima, 0,5 µM dos oligonucleotídeos direto mutation_forward 5'-TAGGTTTAAACAAACGGAAACAGCTATGACCAT-3' e reverso mutation_reverse 5'-TAGCATATGCGATCTCCCTTTCCCGT-3', 90 ng do plasmídeo pJH-gfp fornecendo a fita molde inicial e 5 U da enzima *GoTaq* DNA polimerase, sem atividade “*proofreading*” (Promega). A reação foi conduzida nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, e 20 ciclos de amplificação com 92 °C por 1 min, 55 °C por 1,5 min e 72 °C por 5 min, terminando com uma extensão final a 72 °C por 7 min (ALPER et al., 2005; ZACCOLO et al., 1996). A cada ciclo as mutações são randomicamente geradas ao longo da sequência amplificada, logo, o produto de PCR final é composto de uma mistura de amplicons diferentes. Este produto de PCR foi utilizado como amostra (1 µL) em uma 2ª reação de PCR utilizando somente dNTPs naturais para remoção dos análogos, com 30 ciclos de amplificação sob as mesmas condições de denaturação, anelamento e amplificação.

Em seguida, 1-3 µg de vetor pJH-gfp e 1-3 µg do produto de PCR foram digeridos com 10 U de cada enzima de restrição Pme I e Nde I (New England Biolabs) a 37 °C por 1 h em volume final de 30 µL de acordo com as instruções do fabricante, para remover o a sequência pL5 original e criar extremidades compatíveis. Os produtos da digestão de vetor e produto de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE para separação das bandas e as bandas correspondentes foram excisadas do gel e purificadas utilizando-se o kit GFX Gel Band and PCR Purification Kit (GE) segundo instruções do fabricante.

Após a quantificação do DNA de vetor e inserto por leituras de absorbância no aparelho Nanodrop 1000 (Thermo), fez-se uma reação de ligação a 4 °C por 16 h utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase (Promega) segundo intruções do fabricante. O produto de ligação foi inteiramente utilizado para transformar alíquotas de *E. coli* DH5α (Invitrogen) competentes por choque térmico e selecionadas por resistência a canamicina. As colônias transformantes foram utilizadas para gerar a preparação plasmidial, denominada pJK.

3.10.3 Screening de *M. smegmatis*::pJK

Alíquotas de *M. smegmatis* mc² 155 foram transformadas, com a biblioteca de plasmídeos pJK de promotores mutagenizados, por eletroporação (2,5 kV, 25 μ F, 1000 Ω) e inoculadas em placas de MB7H10-kan. Após 3-4 dias sob incubação a 37 °C cerca de 200 das colônias transformantes foram coletadas após inspeção visual da placa observando por fenótipos distintos e estas inoculadas em 0,1 mL de meio de MB7H9-kan por 16-24 h. Este crescimento inicial foi utilizado como inóculo para um 2º cultivo em 1 mL de MB7H9-kan por 16 h, de forma a uniformizar o crescimento entre os diferentes mutantes a ser analisados.

Os cultivos foram analisados em duplicata em um fluorímetro Victor 3 (Perkin Elmer, Waltham, CA, EUA), usando-se placas escuras de 96 poços com fundo transparente (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) próprias para a leitura de absorbância e fluorescência na mesma amostra possibilitando a correlação entre densidade ótica (D.O.₆₂₀) e unidades de fluorescência (F.U._{485/535}), pelo cálculo da fluorescência relativa (RFU = F.U./D.O.). Do total de cerca de 200 transformantes analisados, 14 foram sequenciados e 9 – representando a distribuição de fluorescência relativa – foram selecionados para as análise por citometria de fluxo.

3.10.4 Caracterização de *M. smegmatis*::pJK

Nove cepas de *M. smegmatis*::pJK selecionadas foram inoculadas em 5 mL de MB7H9-kan e incubadas a 37 °C até a fase exponencial e o plasmídeo extraído utilizando-se o kit plasmidPrep Mini Spin (GE), segundo instruções do fabricante. Visto que a extração plasmidial de *M. smegmatis* utilizando este kit não é eficiente, uma 2ª transformação em *E. coli* DH5 α foi necessária para recuperar o plasmídeo. Esta extração plasmidial, por sua vez, foi sequenciada e utilizada para retransformar novas alíquotas de *M. smegmatis* competentes. Estes novos transformantes foram cultivados em MB7H9-kan e analisados: crescimento por análise da D.O.₆₂₀ em espectrofotômetro Ultraspec 2000 (Thermo) e fluorescência (FITC-H) por citometria de fluxo em aparelho de FACS Canto II (BD Biosciences).

3.10.5 Citometria de fluxo e microscopia confocal

As amostras de *M. smegmatis*::pJK e BCG::pJK foram cultivadas em meio MB7H9-kan ou MB7H9-OADC-kan, respectivamente. A análise da fluorescência por citometria de fluxo das cepas de *M. smegmatis*::pJK foi realizada pela coleta de alíquotas em diferentes

períodos. A população bacteriana foi selecionada por “gate” de acordo com os parâmetros de volume celular (FSC do inglês “*forward scatter channel*”) e complexidade intracelular (SSC do inglês “*side scatter channel*”).

Em seguida, verificou-se a intensidade de fluorescência da população micobacteriana selecionada pelo filtro de FITC-H_{488/525} (do inglês “*fluorescein isothiocyanate*”). A mediana de FITC-H foi determinada pelo software do citômetro de fluxo, FlowJo 7.6.5. (TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA).

Alíquotas de algumas amostras de *M. smegmatis*::pJK cultivadas foram utilizadas para confecção de lâminas para microscopia. As bactérias foram analisadas em um microscópio confocal LSM-510 META (Zeiss), utilizando o laser de 488nm para excitação e o filtro de emissão BP500-550.

3.11 Adaptabilidade dos plasmídeos pJK

Para analisar a capacidade dos promotores mutagenizados na expressão dos antígenos de *S. mansoni*, os vetores com promotores mutantes pJK-B7 e pJK-A2 (representando promotores fortes para eGFP) e pJK-C1 (representando um promotor fraco para eGFP) foram utilizados para direcionar a expressão de *sm29opt* e *smtsp-2opt*, ambos fragmentos gênicos com códons otimizados.

As sequências nucleotídicas de *sm29opt* e *smtsp-2opt* foram amplificadas por PCR como descrito anteriormente (Item 3.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)) utilizando os oligonucleotídeos direto *sm29opt*.L5.F 5’ – TAGCATATGAGCGTCAGCATTTCCGAA – 3’ e reverso *sm29opt*.L5.R 5’ – TTAATTGGTCATACCATTTGCA – 3’ para amplificação de *sm29opt*. Para amplificação de *smtsp-2opt* foram utilizados os oligonucleotídeos direto *tsp2opt*.L5.F 5’ – TAGCATATGGAGAAACCGAAAGTGAAAAAG – 3’ e reverso *tsp2opt*.L5.R 5’ – TTAATGTGCCTTGCTCAGGT – 3’ para clonagem nos plasmídeos pJK sob os sítios de restrição Nde I e EcoR V.

Os plasmídeos pJK foram digeridos com Nde I e EcoR V a 37 °C por 1 h e corridos em um gel de agarose 1% para remover o fragmento referente ao gene *egfp* e recuperar o plasmídeo excisando as bandas correspondentes dos géis e purificando os plasmídeos linearizados através do Kit GFX Gel Band and PCR Purification, conforme instruções do fabricante. Os novos insertos, por sua vez, foram digeridos com Nde I nas mesmas condições e posteriormente tratados com a enzima T4 PNK (New England Biolabs) para criação dos grupos fosfato necessários á reação de ligação, conforme instruções do fabricante. Plasmídeos

e insertos digeridos foram então ligados a 4 °C por 16 h utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Promega). O produto de ligação foi utilizado para transformar alíquotas de *E. coli* DH5α (Invitrogen) por choque térmico, selecionando os transformantes por resistência a canamicina. No outro dia, as colônias transformantes, foram cultivadas para extração plasmidial e analisadas por sequenciamento automático para confirmar a correta inserção dos fragmentos.

Estes plasmídeos, denominados pJK-B7.TSP2, pJK-C1.TSP2, pJK-B7.Sm29 e pJK-C1.Sm29 foram utilizados na transformação de BCG Moreau competente, conforme descrito anteriormente (Item 3.2.3 *M. bovis* BCG eletrocompetente). A análise da expressão foi realizada assim como descrito previamente (Item 3.7.1 Análise da expressão por Western blot) utilizando anticorpos específicos anti-TSP-2 (1:1000) e anti-Sm29 (1:1000) gerados previamente. A revelação da reação de peroxidação com o Kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA, EUA) e registrada no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE).

4 RESULTADOS

4.1 Construção dos vetores de expressão usando genes nativos e análise da expressão em *M. smegmatis* e BCG recombinante

Os genes *sm29*, *smval-4*, *smval-5*, *smtsp-2*, *smstolp-2* foram clonados nos plasmídeos pLA71, pLA73 e pMIP12. A correta inserção das sequências foi confirmada por sequenciamento automático. A partir da transformação de *M. smegmatis* e BCG com as construções plasmidiais, os extratos proteicos de clones de cada cepa foram analisados por *Western blot*, utilizando anticorpos específicos para cada antígeno. Estes anticorpos foram previamente gerados a partir de camundongos imunizados com as respectivas proteínas recombinantes purificadas de *E. coli*.

A análise de expressão dos clones de *M. smegmatis* e BCG transformados com os diferentes vetores de expressão demonstrou que não foi possível observar expressão para os transformantes com os vetores contendo os genes de *sm29*, *smval-4*, *smval-5* e *smtsp-2*.

4.1.1 Expressão de *SmStoLP-2* em *M. smegmatis* e BCG

O *Western blot* dos extratos proteicos de rSmeg::pMIPSto apresentaram uma banda imunorreativa em torno de 45 kDa, a mesma altura da proteína recombinante rStoLP-2. Em alguns clones foi possível observar uma outra banda imunorreativa de maior massa molecular, possivelmente devido a uma dimerização da proteína (Figura 16, A). Os extratos proteicos de rSmeg::pLA71Sto também revelaram a mesma banda imunorreativa em torno de 45 kDa, na mesma altura da proteína recombinante (Figura 16, B). O que significa que a fusão com a sequência sinal de β -lactamase não foi estável. Por outro lado, não foi possível detectar a expressão nos extratos proteicos da construção rSmeg::pLA73Sto.

Figura 16 – Western blot de rSmeg::pMIPSto e rSmeg::pLA71Sto. A) extrato proteico de rSmeg::pMIPSto – 3 clones; *M. smegmatis* transformado com pMIP12 – 3 clones (controle negativo); e rStoLP-2 (300 ng, controle positivo). B) rSmeg::pLA71Sto – 3 clones e rStoLP-2 (300 ng). PM) Marcador de peso molecular (em kDa).

O padrão de imunorreações observado nas cepas de rBCG transformados com os vetores contendo *smstolp-2* (Figura 17) é semelhante ao observado nos extratos proteicos de rSmeg. Os extratos proteicos dos clones de rBCG transformados com pLA71Sto apresentaram uma banda imunorreativa em torno de 45 kDa, assim como os clones de rBCG::pMIPSto. Também nos clones de BCG transformados com pMIPSto, e em menor proporção, nos clones transformados com pLA71Sto, foi possível observar uma outra banda imunorreativa de maior massa molecular, possivelmente um produto de dimerização da proteína (Figura 17).

Figura 17 – Western blot de rBCG::pLA71Sto, rBCG::pLA73Sto e rBCG::pMIPSto. rStoLP-2 (300 ng, controle positivo); rBCG::pLA71Sto, rBCG::pLA73Sto e rBCG::pMIPSto) extratos proteicos de 2 clones dos referidos rBCGs; rBCG::pLA71, rBCG::pLA73 e rBCG::pMIP) extratos proteicos de BCG transformado com os vetores sem o inserto *smstolp-2*. PM) Marcador de peso molecular (em kDa).

4.1.2 Localização de SmStoLP-2 em rBCG::pLA71Sto e rBCG::pMIPSto

Os extratos proteicos de rBCG::pLA71Sto e rBCG::pMIPSto foram submetidos a fracionamento com detergente, separando as frações subcelulares, sobrenadante e precipitado, são separados em frações solúvel e insolúvel. A fração solúvel representa o citosol intracelular e a fração insolúvel representa a fração associada à membrana ou à parede celular.

O fracionamento destas cepas de rBCG expressando SmStoLP-2 demonstrou que quando esta proteína está em fusão com a sequência sinal da β -lactamase (em pLA71), uma parte da proteína encontra-se na parte solúvel do precipitado (Figura 18, A), o que não ocorre sem a sequência sinal (em pMIP12), mas neste caso, o antígeno está mais enriquecido na fração insolúvel do sobrenadante (Figura 18, B).

A) rBCG::pLA71Sto

B) rBCG::pMIPSto

Figura 18 – Localização de SmStoLP-2 em rBCG::pLA71Sto e rBCG::pMIPSto. Os extratos proteicos totais, separados em sobrenadantes e precipitados (pellet), de A) rBCG::pLA71Sto e B) rBCG::pMIPSto, foram tratados para separação das proteínas solúveis e insolúveis. total) extrato proteico total de rBCG; sobrenadante) fração de sobrenadante do produto lisado; pellet) fração de precipitado do produto lisado; sol) fração solúvel; ins) fração insolúvel. PM) O marcador de peso molecular (em kDa).

4.1.3 Resposta imune induzida por rBCG::pLA71Sto e rBCG::pMIPSto

Uma vez demonstrada a expressão do antígeno estomatina em rBCG, foram produzidas preparações vacinais a partir destas cepas e avaliou-se a resposta imune humoral e celular induzidas pela imunização de camundongos C57BL/6 com duas doses de 1×10^6 CFU destas duas cepas rBCG::pLA71Sto e rBCG::pMIPSto.

A resposta imune humoral foi determinada pela produção de anticorpos IgG anti-SmStoLP-2 dos animais imunizados com as cepas recombinantes ou selvagem de BCG. Os resultados demonstram que somente a cepa rBCG::pMIPSto é capaz de induzir níveis significativos de anticorpos anti-SmStoLP-2 em relação ao grupo imunizado com BCG ou salina (Figura 19).

Figura 19 – Anticorpos IgG anti-SmStoLP-2 induzidos por rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com 10^6 CFU de BCG, rBCG::pMIPSto ou rBCG::pLA71Sto em duas doses com 30 dias de intervalo. A dosagem de anticorpos anti-SmStoLP-2 foi determinada por ELISA analisando a absorbância a 492 nm (* $p < 0,001$).

A resposta imune celular foi avaliada por ELISPOT, pela determinação do número de esplenócitos produtores de IFN- γ quando estimulados *in vitro* com o antígeno SmStoLP-2. Os resultados evidenciam uma maior produção de IFN- γ do grupo imunizado com rBCG::pMIPSto em relação aos outros grupos controles salina ou BCG. O grupo imunizado com rBCG::pLA71Sto não apresenta diferença estatística em relação aos outros grupos (Figura 20).

Figura 20 – ELISPOT para IFN- γ dos esplenócitos de animais imunizados com rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto. Os esplenócitos de camundongos imunizados com BCG, rBCG ou salina foram coletados. 2×10^6 células foram estimuladas por 72 h com a proteína rStoLP-2 ($1 \mu\text{g/mL}$). O número de células expressando IFN- γ quando estimuladas foi determinado por ELISPOT (* $p < 0,05$).

Não observamos diferença no número de células produtoras de IL-4 quando estimuladas *in vitro* com rStoLP-2 em nenhum dos grupos experimentais (Figura 21).

Figura 21 – ELISPOT para IL-4 dos esplenócitos de animais imunizados com rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto. Os esplenócitos de camundongos imunizados com BCG, rBCG ou salina foram coletados e as células estimuladas por 72 h com a proteína recombinante rStoLP-2. O número de células expressando IL-4 quando estimuladas foi determinado por ELISPOT.

4.1.4 Ensaios de desafio e proteção

Após perfusão pela artéria aorta para recuperar os parasitas no estágio de verme adulto, não observamos diferenças entre nenhum dos grupos experimentais (FIGURA 22).

Figura 22 – Desafio dos animais imunizados com rBCG expressando SmStoLP-2. Os grupos de camundongos foram imunizados com salina, BCG ou rBCG. Após o desafio com cercárias foi realizada a perfusão para recuperação dos vermes adultos. No gráfico estão representados o número de vermes recuperados em cada animal, por grupo.

A semelhança encontrada no número de vermes recuperados reflete o número de ovos do parasita encontrados no fígado. A contagem de ovos demonstra que a imunização dos animais por BCG ou rBCG não altera a oviposição. Apesar da grande variação na contagem de ovos no grupo imunizado com rBCG::pLA71Sto, nenhum destes eventos é dado como “outlier” (Figura 23).

Figura 23 – Oviposição no fígado dos camundongos imunizados com rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto. Dos mesmos animais cujos vermes foram recuperados pela perfusão da artéria aorta, uma seção do fígado foi coletada e o número de ovos foi contado e normalizado. No gráfico estão representados o número de ovos recuperados por grama de fígado de cada camundongo, por grupo.

4.2. Construção dos vetores de expressão usando genes com códons otimizados e análise da expressão em *M. smegmatis* e BCG recombinante

Uma vez que utilizando genes nativos só foi possível obter expressão de SmStoLP em rBCG, decidimos utilizar sequências com códons otimizados. As sequências com códons otimizados de *sm29opt*, *smval-5opt* e *smtsp-2opt* foram clonadas nos vetores pLA71 e pMIP12 e a correta inserção das sequências foi confirmada por sequenciamento automático. Alíquotas de *M. smegmatis* e BCG competentes foram transformadas com os vetores de expressão resultantes e clones de *M. smegmatis* e BCG recombinantes foram isolados de cada construção.

Os extratos proteicos dos clones gerados a partir da transformação de *M. smegmatis* e BCG foram analisados por *Western blot*, utilizando os anticorpos específicos para cada antígeno.

4.2.1 Expressão de SmVAL-5 em *M. smegmatis*

A sequência nucleotídica de *smval-5opt* foi sintetizada de forma a utilizar os códons preferenciais de micobactéria e clonada nos vetores pMIP12 e pLA71. A cepa de *M. smegmatis* recombinante foi analisada por *Western blot*.

Nos extratos de *M. smegmatis* recombinante transformada com pMIPVAL-5opt, observa-se uma intensa imunorreação entre 20.1 e 30 kDa, nos extratos de pellet (Figura 24). O tamanho esperado da proteína é de 22.6 kDa, uma vez que somente uma porção da sequência nucleotídica de SmVAL-5 foi otimizada e clonada nos vetores de expressão. A proteína recombinante purificada de *E. coli* foi expressa na totalidade de seu mRNA predito, ocasionando a diferença de tamanho.

Além da reação ao antígeno SmVAL-5 expresso por rSmeg, várias outras reações inespecíficas são observadas nos extratos, fato observado com frequência dada a constituição do antisoro (majoritariamente de anticorpos policlonais) e dos extratos proteicos de micobactéria, que por sua vez, possuem uma ampla variedade de proteínas. Estas reações inespecíficas são observadas em muitos dos *immunoblots* revelados.

Figura 24 – Western blot de rSmeg::pMIPVAL-5opt. rSmeg::pMIP) o extrato proteico de *M. smegmatis* transformado com pMIP12 (controle negativo); rVAL-5) proteína recombinante rVAL-5 (200 ng, controle positivo); rSmeg::pMIPVAL-5opt) extrato proteico de clones (1 e 2) desta cepa; P) fração de pellet e S) fração de sobrenadante do produto sonicado. PM) Marcador de peso molecular (em kDa).

Os extratos proteicos de *M. smegmatis* transformado com pLA71VAL-5opt não demonstram quaisquer bandas imunorreativas distintas do extrato proteico de *M. smegmatis* selvagem, utilizado com controle negativo (Figura 25). Também fica evidenciada a constituição proteica distinta das frações de P (pellet) e S (sobrenadante) do produto lisado.

Figura 25 – Western blot de rSmeg::pLA71VAL-5opt. rSmeg::pLA71) extrato proteico de *M. smegmatis* transformado com pLA71 (controle negativo); rVAL-5) proteína recombinante rVAL-5 (200 ng, controle positivo); rSmeg::pLA71VAL-5opt) extrato proteico de clones (1 e 2) desta cepa. P) fração de pellet e S) fração de sobrenadante do produto sonificado. PM) Marcador de peso molecular (em kDa).

Apesar de detectarmos a expressão de SmVAL-5 nos extratos proteicos de rSmeg::pMIPVAL-5, a mesma não pode ser observada nos extratos de rBCG::pMIPVAL-5 ou rBCG::pLA71VAL-5 (Figura 26) e há bandas imunorreativas de maior peso molecular, entretanto estas bandas também aparecem nos extratos de BCG selvagem e não referem-se ao produto esperado.

Figura 26 – Western blot de rBCG::pMIPVAL-5opt e rBCG::pLA71VAL-5opt. BCG wild-type) extrato proteico de BCG selvagem (controle negativo); rVAL-5) proteína recombinante rVAL-5 (200 ng, controle positivo); rBCG::pMIPVAL-5opt) extrato proteico de clones (1 e 2) desta cepa. P) fração de pellet e S) fração de sobrenadante do produto sonicado. PM) Marcador de peso molecular (em kDa).

4.2.2 Expressão de *SmTSP-2* em *M. smegmatis*

Assim como para *smval-5opt*, a sequência de *smtsp-2opt* também foi sintetizada de forma a utilizar os códons preferenciais de micobactéria e clonada nos vetores de expressão pMIP12 e pLA71, gerando assim pMIPTSP-2opt e pLA71TSP-2opt. Em seguida, as cepas de *M. smegmatis* recombinantes foram analisadas por *Western blot*.

Foi possível distinguir nos extratos proteicos dos clones de *M. smegmatis* recombinantes uma banda imunorreativa em torno de 14.4 kDa na fração de pellet que não está presente nos extratos de *M. smegmatis* selvagem (Figura 27).

Figura 27 – Western blot de rSmeg::pMIPTSP-2opt. rSmeg::pMIP) extrato proteico de *M. smegmatis* transformado com pMIP12 (controle negativo); rTSP-2) proteína recombinante rTSP-2 (200 ng, controle positivo); rSmeg::pMIPTSP-2opt) extrato proteico de clones (1 e 2) desta cepa. P) fração de pellet e S) fração de sobrenadante do produto sonicado. PM) Marcador de peso molecular (em kDa).

Não observamos diferenças nas imunorreações dos extratos proteicos de *M. smegmatis* selvagem e *M. smegmatis* transformado com pLA71TSP-2opt (Figura 28).

Figura 28 – Western blot de rSmeg::pLA71TSP-2opt. rSmeg::pLA71) extrato proteico de *M. smegmatis* transformado com pLA71 (controle negativo). rTSP-2) proteína recombinante rTSP-2 (200 ng, controle positivo); rSmeg:: pLA71TSP-2opt) extrato proteico de clones (1 e 2) desta cepa. P) fração de pellet e S) fração de sobrenadante do produto sonicado. PM) Marcador de peso molecular (em kDa).

Apesar de detectarmos a expressão de SmTSP-2 em *M. smegmatis* transformado com pMIPTSP-2opt, nos extratos de BCG transformado com o mesmo vetor não foi possível detectar a expressão de SmTSP-2 (Figura 29).

Figura 29 – Western blot de rBCG::pMIPTSP-2opt. BCG wild-type) extrato proteico de BCG selvagem (controle negativo); rTSP-2) proteína recombinante rTSP-2 (200 ng, controle positivo); rBCG::pMIPTSP-2opt) extrato proteico de clones (1 e 2) desta cepa. P) fração de pellet e S) fração de sobrenadante do produto sonicado. PM) Marcador de peso molecular (em kDa).

4.2.3 Expressão de Sm29

Por *Western blot* não foi possível detectar a expressão de Sm29, mesmo com sua sequência de códons otimizada, em *M. smegmatis* (Figura 30 e Figura 31) ao utilizarmos pMIP12, que demonstrou ser capaz de induzir a expressão de SmStoLP-2, SmVAL-5 e SmTSP-2 nessa espécie.

Figura 30 – Western blot de rSmeg::pMIPSm29opt. rSmeg::pMIP) extrato proteico de *M. smegmatis* transformado com pMIP12 (controle negativo); rSm29) proteína recombinante rSm29 (200 ng, controle positivo); rSmeg:: pMIPSm29opt) extrato proteico de clones (1 e 2) desta cepa. P) fração de pellet e S) fração de sobrenadante do produto sonicado. PM) Marcador de peso molecular (em kDa).

Nos extratos proteicos de rSmeg::pLA71Sm29opt não foi possível determinar se o antígeno está sendo expresso pois há uma reação inespecífica em posição semelhante ao controle positivo rSm29 nas frações de pellet também no extrato proteico de *M. smegmatis* selvagem (Figura 31).

Figura 31 – Western blot de rSmeg::pLA71Sm29opt. rSmeg::pLA71) extrato proteico de *M. smegmatis* transformado com pLA71 (controle negativo); rSm29) proteína recombinante rSm29 (200 ng, controle positivo); rSmeg:: pLA71Sm29opt) extrato proteico de clones (1 e 2) desta cepa. P) fração de pellet e S) fração de sobrenadante do produto sonicado. PM) Marcador de peso molecular (em kDa).

Nos extratos proteicos de BCG transformado com pMIPSm29opt não detectamos bandas imunorreativas ao soro anti-Sm29 que pudessem indicar sua expressão (Figura 32).

Figura 32 – Western blot de rBCG::pMIPSm29opt. BCG wild-type) extrato proteico de BCG (controle negativo); rSm29) proteína recombinante rSm29 (200 ng, controle positivo); rBCG:: pMIPSm29opt) extrato proteico de clones (1 e 2) desta cepa. P) fração de pellet e S) fração de sobrenadante do produto sonicado. PM) Marcador de peso molecular (em kDa).

4.3 Geração de promotores mutagenizados por “error-prone” PCR

Mesmo utilizando diferentes vetores de expressão e genes sintéticos, tivemos dificuldades em obter cepas de BCG expressando os antígenos de *Schistosoma*, o que nos levou a trabalhar no aperfeiçoamento da regulação da expressão através da mutação de um promotor micobacteriano escolhido. O promotor pL5, original do micobacteriófago L5 foi o molde para a reação de “error-prone” PCR. Assim mutações randômicas nos amplicons da reação foram geradas e estes amplicons, em seguida, foram ligados à montante da sequência de *egfp*, criando-se assim uma biblioteca de plasmídeos com promotores mutagenizados, denominados pJK.

Com base na fluorescência gerada pela expressão de eGFP, direcionada pelos promotores mutagenizados pJK ou pelo plasmídeo original pJH-gfp, determinou-se a fluorescência relativa, que se refere ao número de moléculas eGFP presentes na amostra, sendo uma medida indireta da tradução.

4.3.1 Crescimento e fluorescência de *M. smegmatis*::pJH-gfp

A correlação entre densidade ótica (D.O.₆₂₀) e fluorescência (F.U.) para *M. smegmatis* transformado com o plasmídeo não mutagenizado pJH-gfp é relativamente linear entre 0,6 e 1,2 (Figura 33, $R^2 = 0,7829$).

Figura 33 – Fluorescência e densidade ótica de *M. smegmatis*::pJH-gfp. A correlação entre crescimento (absorbância a 620 nm) e fluorescência (unidades de fluorescência, F.U.) contendo o promotor pL5 original observada é de $R^2 = 0,7829$.

4.3.2 Screening de *M. smegmatis*::pJK

Alíquotas de *M. smegmatis* competentes foram transformadas com a biblioteca de plasmídeos pJK e os transformantes (denominados *M. smegmatis*::pJK) analisados com relação à fluorescência (F.U._{485/535}) e crescimento (D.O.₆₂₀) (Figura 34).

Figura 34 – Correlação entre fluorescência e densidade ótica dos transformantes *M. smegmatis*::pJK. Cerca de duzentos transformantes de *M. smegmatis* transformadas com a biblioteca de plasmídeos pJK foram cultivadas e analisadas quanto a fluorescência (F.U._{485/535}) e densidade ótica (D.O.₆₂₀).

É possível observar a ampla variação da fluorescência entre os transformantes de *M. smegmatis*::pJK avaliados. A imprevisibilidade da relação entre absorbância e fluorescência ($R^2 = 0,1291$) de *M. smegmatis*::pJK demonstra que a fluorescência observada agora, não mais se correlaciona com a absorbância da amostra.

A correlação entre D.O. e F.U de cada transformante *M. smegmatis*::pJK foi convertida em fluorescência relativa (RFU), dividindo-se as unidades de fluorescência pela densidade ótica (RFU = F.U./D.O.), objetivando normalizar os valores de absorbância entre os transformantes *M. smegmatis*::pJK. Vinte e dois transformantes representativos da variação de fluorescência foram selecionados e plotados no gráfico abaixo (Figura 35).

Figura 35 – Fluorescência relativa de *M. smegmatis*::pJK. *M. smegmatis* wild-type, *M. smegmatis*::pJH-gfp e 22 transformantes *M. smegmatis*::pJK demonstram diferentes níveis de fluorescência.

4.3.3 Sequência nucleotídica dos promotores mutagenizados

Dos 22 *M. smegmatis*::pJK, 14 tiveram o DNA plasmidial extraído. Estes 14 plasmídeos tiveram a sequência do promotor a montante de *egfp* analisada, excetuando-se o plasmídeo denominado pJK-F8, o qual não foi possível obter um sequenciamento confirmatório. O promotor do plasmídeo pJK-F6 apresentou uma deleção na posição 240 sendo um possível erro de leitura do sequenciamento, dada sua localização na região onde o oligonucleotídeo reverso se anela. Comparados à sequência original, os promotores destes plasmídeos estavam alterados entre 3,5 – 11,3% (Figura 36).

Apesar das alta taxa de mutação, com base no sequenciamento não foi possível realizar qualquer associação entre as bases alteradas, seja em quantidade ou qualidade, e os níveis de fluorescência obtidos.

Figura 36 – Sequência nucleotídica dos promotores mutagenizados. A sequência do promotor pL5 contido em 14 plasmídeos recuperados de *M. smegmatis*::pJK foi sequenciada. Com relação à sequência original, as bases alteradas (em fundo branco) representam entre 3,5-11,3% do total de bases da sequência.

4.3.4 Caracterização de *M. smegmatis*::pJK

Nove cepas de *M. smegmatis*::pJK foram cultivadas até a fase exponencial e analisadas por citometria de fluxo para determinação da fluorescência, medida por FITC-H (488/530). Com base na complexidade intracelular (SSC-A) e volume celular (FSC-A) os eventos relativos ao crescimento bacteriano foram selecionados por “gate” e desta população gerou-se um histograma com base no valor de FITC-H. Ainda, a mediana da fluorescência foi determinada ().

Observando o histograma abaixo podemos observar que as cepas *M. smegmatis*::pJK-A6, pJK-F8, pJK-E3, pJK-A2 e pJK-B7 apresentam fluorescência semelhante. *M. smegmatis*::pJK-D6 e pJK-E6 apresentam uma fluorescência intermediária das outras cepas, *M. smegmatis*::pJK-C1 apresenta uma fluorescência baixa e *M. smegmatis*::pJKD9 não apresenta fluorescência.

Figura 37 – Fluorescência de *M. smegmatis*::pJK por citometria de fluxo. Os eventos referentes à *M. smegmatis* foram selecionados e intensidade da fluorescência (FITC-H log10) determinada no histograma. Na figura estão representados *M. smegmatis*::pJK e ordenados de acordo com a mediana de FITC-H. O histograma mais inferior refere-se à *M. smegmatis* selvagem.

O histograma acima reflete todos os eventos selecionados por “gate”. O valor numérico para a fluorescência observada para cada cepa foi estabelecido pela mediana do valor de FITC-H, assim obtendo uma medida mensurável, posteriormente utilizada para comparar a fluorescência determinada pelos promotores mutagenizados em BCG (Figura 38).

Figura 38 – Intensidade da fluorescência de *M. smegmatis*::pJK. *M. smegmatis*::pJK e *M. smegmatis* wild-type em fase log de cultivo foram analisadas por citometria de fluxo e a mediana de FITC-H determinada.

A fluorescência para a população também se mantém constante ao longo do crescimento analisando as amostras por citometria de fluxo. Neste experimento, três clones de cada uma das amostras foram inoculados em meio MB7H9-kan e seu crescimento acompanhado retirando alíquotas em tempos determinados. Após “gate” da população micobacteriana, a mediana de FITC-H foi determinada para cada amostra desde o inóculo onde a densidade ótica inicia-se em torno de D.O.₆₂₀ 0,1 ao ponto final de até D.O.₆₂₀ 2,5. Observamos que há uma pequena variação inicial da fluorescência no início da fase logaritmica (< D.O.₆₂₀ 0,6). Com o aumento da densidade ótica o valor de FITC-H tende a elevar-se, mas a intensidade se mantém relativamente constante (Figura 39).

Figura 39 – A fluorescência de *M. smegmatis*::pJK se mantém constante ao longo do crescimento. Três clones de cada *M. smegmatis*::pJK foram cultivados em MB7H9 e alíquotas retiradas em determinados períodos. A amostra foi analisada por fluorescência e densidade ótica.

Posteriormente, determinamos a curva de crescimento das cepas analisando a densidade ótica (D.O.₆₂₀) da amostra em razão do tempo de cultivo, a fim de observar se a expressão diferenciada de eGFP poderia de alguma maneira retardar ou inibir a duplicação das células. A curva de crescimento das cepas *M. smegmatis*::pJK (Figura 40) demonstra não existir influência da expressão de eGFP que seja capaz de inibir ou impedir a replicação a ponto de retardar a densidade ótica da cultura.

Figura 40 – Curva de crescimento de *M. smegmatis*::pJK. O crescimento das cepas transformadas foi acompanhado durante desde o inóculo inicial em MB7H9-kan.

Para demonstrar que a diferença em fluorescência observada entre estas cepas recombinantes não é dada pela contínua acumulação de eGFP intracelular, o exemplo abaixo de *M. smegmatis*::pJK-D6 (Figura 41) demonstra os eventos no decorrer do crescimento micobacteriano, que também ocorrem para as outras amostras.

A população micobacteriana destas cepas expressando eGFP conterá em maior ou menor proporção fenótipos diferentes. Ao inóculo e nas primeiras horas, até 3 fenótipos são observados. Um não fluorescente e dois fluorescentes de intensidades distintas (Figura 41, inoculum-4h). Nas primeiras duas horas (Figura 41, 1h-2h), a população não fluorescente aumenta. Após 3 h (Figura 41, 3h) a grande maioria das células está fluorescente e há uma pequena parcela que apresenta fluorescência intermediária, que diminui gradualmente. Após 8 h de incubação poucas células apresentam este fenótipo intermediário (Figura 41, 8 h).

Cada cepa *M. smegmatis*::pJK concentra sua população fluorescente em uma faixa específica de fluorescência. Assim, cronologicamente, as células em cultivo primeiro replicam-se para então iniciar a expressão de eGFP até um determinado nível específico, de acordo com cada plasmídeo pJK e as mutações contidas em seu promotor.

Figura 41 – Crescimento e fluorescência de *M. smegmatis*::pJK-D6 em cultivo. *M. smegmatis*::pJK-D6 foi inoculado em MB7H9 alíquotas retiradas a cada hora e a fluorescência destas amostras foi analisada por citometria de fluxo.

De fato, a análise microscópica de uma das amostras demonstra uma população heterogênea quanto à expressão de eGFP. Utilizando como exemplo *M. smegmatis*::pJK-D6 observamos que algumas bactérias apresentam fluorescência e outras não (Figura 42). A fluorescência heterogênea nas bactérias individuais, mas isto decorre do equipamento confocal utilizado que analisa um plano focal específico.

Figura 42 – Microscopia de fluorescência confocal (FLUOR) do cultivo de *M. smegmatis*::pJK-D6. Fluorescência confocal (FLUOR) e o respectivo contraste por interferência diferencial (DIC) demonstram um fenótipo heterogêneo de *M. smegmatis*::pJK-D6 no início da fase logarítmica ($> D.O_{620} 0,6$).

4.3.5 Caracterização de BCG::pJK

Figura 43 – Fluorescência de BCG::pJK. A fluorescência de BCG::pJK e BCG wild-type em fase log foi analisada por citometria de fluxo e a mediana de FITC-H determinada. BCG::pJK-A6 e pJK-A2 não originaram colônias transformantes.

Os mesmos plasmídeos pJK foram utilizados para transformar cepas de BCG Pasteur para avaliar a “força de expressão” determinada pelos plasmídeos entre as espécies, uma vez que os promotores mutantes foram triados em *M. smegmatis*. Observamos um perfil similar à *M. smegmatis* transformados com os mesmos plasmídeos, com pJK-F8 e pJK-B7 gerando recombinantes que demonstram uma maior fluorescência, pJK-D6 e pJK-E6 uma

fluorescência mediana e pJK-C1 com a fluorescência mais baixa, porém acima da cepa selvagem de BCG Pasteur (Figura 43 e Figura 44).

Figura 44 – Fluorescência de BCG::pJK analisada por citometria de fluxo. BCG foi transformado com os plasmídeos selecionados, e na fase log analisados por citometria de fluxo quanto ao pico de FITC-H. Na figura estão representados os histogramas de BCG::pJK ordenados de acordo com a mediana de FITC-H. O histograma inferior refere-se à fluorescência natural apresentada por BCG selvagem.

Figura 45 – Fluorescência induzida pelos vetores pJK em *M. smegmatis* e BCG. A mediana de FITC-H para cada espécie transformada com o mesmo vetor pJK foi determinada e comparada. Estão representados: pJK-C1, pJK-B7, pJK-F8, pJK-D6 e pJK-E6 além de *M. smegmatis* e BCG selvagem.

Ao correlacionarmos a fluorescência obtida para cada espécie, observamos que a força de expressão entre as espécies *M. smegmatis* e BCG quando transformadas com o mesmo plasmídeo pJK é similar (Figura 45, $R^2 = 0,86$). Assim, podemos afirmar que pJK-F8 e pJK-B7 determinam uma alta expressão de eGFP, pJK-D6 e pJK-E6 uma expressão mediana e pJK-C1 uma baixa expressão da proteína, em ambas as espécies. Contudo, para a correlação, excluiu-se a cepa BCG::pJK-E3 que não apresenta fluorescência. Se considerarmos BCG::pJK-E3 a correlação é de $R^2 = 0,37$. Não obtivemos transformantes de BCG para pJK-A6 ou pJK-A2.

4.4 Construção dos vetores de expressão usando promotores mutagenizados e análise da expressão em BCG recombinante

A adaptabilidade destes vetores de promotores mutagenizados, sendo capazes de expressar o gene em diferentes níveis, nos levou à clonagem dos antígenos inicialmente propostos *smtsp-2opt* e *sm29opt* nestes vetores criados. Para isto, utilizamo-nos de 3 vetores: pJK-C1, que induziu baixa fluorescência, e pJK-B7 pJK-A2 que induziram alta fluorescência em em ambos os organismos.

Foram construídos 6 plasmídeos pJK-A2.TSP2opt, pJK-B7.TSP2opt, pJK-C1.TSP2opt, pJK-A2.Sm29opt, pJK-B7.Sm29opt e pJK-C1.Sm29opt. Primeiramente, o gene *egfp* foi removido dos vetores pJK-C1, pJK-B7 e pJK-A2 com enzimas de restrição apropriadas e então, utilizados na ligação aos fragmentos de *smtsp-2opt*, *sm29opt* previamente amplificados por PCR. A correta inserção foi verificada por sequenciamento e o plasmídeo resultante utilizado para transformar alíquotas de BCG competente.

A análise de expressão dos clones de BCG transformados com os diferentes vetores de expressão demonstrou que não foi possível observar expressão para os transformantes com os vetores pJK-A2.TSP2opt, pJK-B7.TSP2opt, pJK-C1.TSP2opt.

4.4.1 Expressão de Sm29 em BCG recombinante

Obtivemos uma imunorreação característica apenas nos extratos proteicos das cepas de BCG transformando com pJK-C1.Sm29opt e pJK-B7.Sm29opt onde se evidencia um padrão de bandas imunorreativas semelhante ao controle positivo (proteína recombinante rSm29 purificada de *E. coli*). rBCG::pJK-A2.Sm29opt apesar de conter um promotor forte para a expressão de eGFP não demonstrou a mesma força para a expressão do antígeno Sm29

(Figura 46). pJK-C1.Sm29opt também contém um promotor mais fraco do que pJK-B7.Sm29opt.

Figura 46 – *Western blot* de rBCG::pJK-C1.Sm29opt, rBCG::pJK-B7.Sm29opt e rBCG::pJK-A2.Sm29opt. BCG wild-type) extrato proteico de BCG (controle negativo); rSm29) proteína recombinante rSm29 (200 ng, controle positivo); rBCG::pJK-A2.Sm29, pJK-B7.Sm29 e pJK-C1.Sm29) sobrenadante do extrato proteico de clones (1 e 2) destas cepas. PM) Marcador de peso molecular (em kDa).

4.4.2 Resposta imune induzida por rBCG-Sm29

A cepa que demonstrou a maior expressão do antígeno Sm29 no *Western blot* foi cultivada e preparada como vacina. Os animais foram imunizados via subcutânea com uma única dose de 1×10^6 CFU de rBCG-Sm29 (rBCG::pJK-B7.Sm29opt). Após 30 dias foram analisadas as respostas imune humoral e celular.

Observamos que não houve a produção de anticorpos IgG anti-Sm29 nos animais imunizados com rBCG-Sm29 (Figura 47). Só foi possível detectar a produção de anticorpos anti-Sm29 no grupo de animais imunizados com rSm29+Alum.

Figura 47 – Anticorpos IgG anti-Sm29 induzidos por rBCG-Sm29. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com salina, 10^6 CFU de BCG ou rBCG-Sm29 ou 25 μ g da proteína recombinante rSm29+Alum. A dosagem de anticorpos anti-Sm29 foi determinada por ELISA analisando a absorbância a 492 nm (* $p < 0,05$).

A análise da resposta imune celular demonstrou que o grupo imunizado com rBCG-Sm29 produziu maior quantidade de IFN- γ , TNF- α e IL-10 (Figura 48) que o grupo imunizado com BCG ou o controle salina, quando estimulados *in vitro* com a proteína recombinante rSm29.

O grupo imunizado com rBCG-Sm29 produziu menores quantidades destas citocinas em comparação ao grupo imunizado com uma dose de 25 μ g de rSm29+Alum. Paralelamente, não pudemos detectar em nenhum dos grupos a produção da citocina IL-4.

Figura 48 – Produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10 pela imunização com rBCG-Sm29.

Animais C57BL/6 foram imunizados com 10^6 CFU de BCG, rBCG-Sm29 ou 25 μ g da proteína rSm29 associada ao adjuvante hidróxido de alumínio (Alum) e sacrificados após 30 dias. Os esplenócitos estimulados por 48 h com rSm29 (20 μ g/mL). A dosagem de citocinas A) IFN- γ , B) TNF- α e C) IL-10 no sobrenadante da cultura foi determinada pelo kit CBA Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences) no citômetro de fluxo FACS Canto II e os dados analisados no software FCAP 3.0. A diferença estatística foi determinada por Two-way ANOVA e Bonferroni (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

5 DISCUSSÃO

5.1 Expressão dos candidatos vacinais em BCG usando genes nativos

As doenças tropicais negligenciadas são uma crescente preocupação no contexto da saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, a esquistossomose é uma das principais doenças negligenciadas que afetam a população.

Neste projeto nos propusemos a investigar o desenvolvimento de uma vacina para esquistossomose a partir da expressão de candidatos vacinais de *S. mansoni*, em BCG recombinante.

Inicialmente testou-se a expressão de diversos genes nativos de candidatos vacinais nos vetores de expressão micobacterianos baseados no promotor de β -lactamase. Os plasmídeos construídos que foram capazes de induzir a expressão do antígeno SmStoLP-2 em rBCG, ou seja, pMIPSto e pLA71Sto, possuem cassetes de expressão que diferem apenas pela existência de uma sequência Shine-Dalgarno ou da sequência sinal da β -lactamase, respectivamente. Os extratos proteicos de rBCG::pMIPSto e rBCG::pLA71Sto apresentaram uma banda imunorreativa em torno de 45 kDa, característica da proteína purificada rStoLP-2 confirmando a expressão do antígeno (Figura 17). Já para o rBCG::pLA73Sto, contendo a fusão da sequência inteira da β -lactamase à SmStoLP-2, não pode ser detectado qualquer banda imunorreativa que pudesse indicar a expressão da proteína de fusão. *M. smegmatis* quando transformada com os mesmos vetores pMIPSto e pLA71Sto apresentou um perfil de expressão semelhante ao de rBCG (Figura 16).

Também foi observado, pela separação das frações celulares por detergente, que a SmStoLP-2 em fusão com o peptídeo sinal da β -lactamase (pLA71Sto), encontra-se em parte no precipitado do extrato total, mas mais enriquecida na fração solúvel ou citosólica do sobrenadante, ao passo que quando expressa com o auxílio de um sítio RBS (pMIPSto), encontra-se mais enriquecida na fração insolúvel do sobrenadante, talvez associada a membranas (Figura 18). É possível que isto seja influenciado pelo fato da fusão da proteína com o peptídeo sinal da β -lactamase não ser estável. Além disto, a eficiência dos sinais de exportação em fusão com diferentes proteínas é variável, e sua localização subcelular é imprevisível como demonstrado por outros trabalhos, inclusive de nosso grupo (MAZZANTINI et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2000; SNAPPER et al., 1988; VARALDO et al., 2004). A própria expressão heteróloga depende de vários fatores determinados pelo promotor, terminador, origem de replicação e marcador de seleção

(DENNEHY; WILLIAMSON, 2005) ou pelo próprio gene a ser expresso como p.ex. o “*codon usage*” preferencial de cada proteína (GUSTAFSSON et al., 2012). Esta série de fatores envolvidos na expressão heteróloga, poderá explicar a ausência da expressão de SmStoLP-2 em fusão à β -lactamase (pLA73Sto) tanto em *M. smegmatis* quanto BCG. O mesmo poderia ser extrapolado para os outros antígenos, cujas expressões também não puderam ser detectadas por *Western blot*.

A localização da SmStoLP-2 na fração associada à membrana de BCG quando expresso pelo vetor pMIPSto, apesar de inesperada, é apoiada pelos dados imunológicos. Apesar de ser pequena a diferença entre os grupos experimentais, estatisticamente, somente os animais imunizados com rBCG::pMIPSto apresentam anticorpos IgG específicos no soro e seus esplenócitos e expressaram a citocina IFN- γ , quando estimulados com o antígeno rStoLP-2. Isto indica que este antígeno quando está localizado no citoplasma da bactéria, não está diretamente acessível ao sistema imune e por isso não é capaz de gerar uma resposta imune específica. A não observação da citocina IL-4 – relacionada ao tipo Th2 da resposta imune – era previsível, pois tanto BCG quanto o antígeno, sob a forma de proteína recombinante, proporcionam uma resposta preferencialmente do tipo Th1, com a indução de IFN- γ e TNF- α (FARIAS et al., 2010; SABLE et al., 2011).

Os camundontos imunizados e desafiados com cercárias demonstrando a recuperação de quantidades similares de vermes nos grupos experimentais indica que não obtivemos o efeito imunológico sinérgico do BCG e o antígeno esperado (Figura 22). Hipotetizamos que apesar de expresso – dados de *Western blot* – e identificado pelo sistema imune – dados de ELISPOT – o estímulo proporcionado pelo antígeno SmStoLP-2 não foi suficiente para gerar uma resposta imune protetora. A quantidade de vermes recuperados reflete na quantidade de ovos encontrados no fígado (Figura 23), que também não demonstrou diferença estatística entre os grupos.

5.2 Expressão dos candidatos vacinais em BCG usando genes otimizados

Genomas micobacterianos possuem essencialmente um alto conteúdo GC, p.ex. o genoma de *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 possui um conteúdo GC de 65,9% (DENNEHY; WILLIAMSON, 2005; NAKAMURA; GOJOBORI; IKEMURA, 2000). Assim sendo, esta característica opõe BCG e as espécies do gênero *Schistosoma*, cujos genomas apresentam um conteúdo GC da ordem de 34% (GENEDB, 2010) (APÊNDICE). Essa diferença em conteúdo GC pode ter sido um dos fatores determinantes na expressão das proteínas de

Schistosoma em BCG, onde apenas um antígeno foi expresso em quantidades detectáveis por *Western blot*.

Um importante fator na expressão gênica heteróloga esta na adaptação dos códons do gene a ser transcrito para utilizar os códons preferenciais do organismo hospedeiro (APÊNDICE B). Visando adequar o “*codon usage*” de BCG adotamos a estratégia de otimização de códons das sequências de SmTSP-2, Sm29 e SmVAL-5, gerando assim as sequências “opt”: *smtsp-2opt*, *sm29opt* e *smval-5opt*, respectivamente. A otimização de códons dos genes de *smtsp-2opt*, *sm29opt* e *smval-5opt* adequa a requisição de tRNAs por parte do gene a ser transcrito para a disponibilidade de tRNAs no hospedeiro micobacteriano – além de elevar seu conteúdo GC. Essas modificações possibilitaram a detecção por *Western blot* da expressão dos antígenos de *smtsp-2opt* e *smval-5opt* em *M. smegmatis* (Figura 27 e Figura 24, respectivamente).

Ao adaptarmos os códons do gene para o organismo hospedeiro é possível aumentar os níveis de expressão do mesmo (KANEKIYO et al., 2005; VARALDO et al., 2006), assim como observado para as cepas de *M. smegmatis* expressando *smtsp-2opt* e *smval-5opt*. Todavia, a expressão de *smstolp-2* com sua sequência nucleotídica original indica que a adaptação dos códons nem sempre é restritiva e que apenas o conteúdo GC não é um fator determinante.

As sequências “opt” foram otimizadas com base nas sequências CDS de *M. bovis* cepa *Pasteur 1173P2*, contudo a expressão de Sm29 e SmVAL-5 de códon otimizado ocorreu em *M. smegmatis mc² 155*, mas não em BCG. Neste caso, inferimos que a causa esteja relacionada à espécie hospedeira pois observamos expressão em um e não em outro hospedeiro. Uma possível explicação poderia estar na tradução das sequências. Se o número e a qualidade em tRNAs no genoma de ambos organismos é similar (CHEN; GOMEZ; BISHAI, 2000; KAROLCHIK et al., 2003), a espécie *M. smegmatis* possui um número muito maior de fatores sigma preditos no genoma (WAAGMEESTER; THOMPSON; REYRAT, 2005) que *M. tuberculosis* (CHEN; GOMEZ; BISHAI, 2000). Por certo, *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG são espécies distintas, entretanto, ambas fazem parte do mesmo grupo de micobactérias constituintes do complexo de *Mycobacterium tuberculosis* ou MTC. Destas espécies altamente relacionadas – genética e fisiologicamente – é esperado que compartilhem muitos dos mesmos fatores de transcrição.

Não podemos excluir que a construção plasmidial tenha sido determinante para a expressão destas sequências. Embora desconheçamos os fatores de transcrição específicos que regulam a atividade do promotor de pMIP12 (pBlaF*), este promotor origina-se de *M.*

fortuitum, espécie muito próxima a *M. smegmatis* (DEVULDER; PEROUSE DE MONTCLOS; FLANDROIS, 2005), explicando talvez a expressão de algumas das proteínas estudadas em *M. smegmatis* e não em BCG. A impossibilidade de confirmar a expressão de Sm29 de códon otimizado tanto em *M. smegmatis* ou BCG indica que além da utilização de códons preferenciais e conteúdo GC, há outros fatores próprios do gene na expressão heteróloga, tornando-a imprevisível.

5.3 Geração de promotores mutagenizados por “error-prone” PCR

A dificuldade de obter cepas recombinantes de BCG expressando os antígenos de *Schistosoma* nos levou a propor o desenvolvimento de promotores micobacterianos alternativos. Baseando-se em uma estratégia de mutação randômica por PCR (ZACCOLO et al., 1996), conseguimos alterar a sequência do promotor pL5 entre 3,5 a 11,3% de sua sequência de bases nitrogenadas. A média e variação das mutações estão em conformidade com os valores observados na literatura (NEVOIGT et al., 2006). Com base no sequenciamento não foi possível associar as bases alteradas – seja em quantidade ou qualidade – aos níveis de fluorescência obtidos. Possivelmente o pequeno número de promotores sequenciados tenha inviabilizado a caracterização das bases específicas relacionadas a maior ou menor expressão, assim como realizado por Jensen (Jensen et al., 2006), cujo trabalho demandou 69 combinações entre “força de expressão” medida por fluorescência e alterações de bases na sequência do promotor.

A variação da expressão da proteína eGFP pelos promotores mutagenizados foi analisada indiretamente pela intensidade da fluorescência das culturas de *M. smegmatis* transformado com a biblioteca de plasmídeos pJK. Paralelamente também foram determinadas as absorbâncias a 620 nm dos cultivos, uma medida indireta do crescimento bacteriano. Ao se comparar densidade ótica e fluorescência dos cultivos antes e depois da mutagênese observa-se uma mudança na correlação (R^2 variou de 0,7829 para 0,1291) (Figura 33 e Figura 34), mostrando que após a mutagênese randômica do promotor a densidade ótica da amostra não reflete mais a fluorescência esperada. De fato, uma variação de fluorescência da ordem de 300 vezes emerge entre os transformantes *M. smegmatis*::pJK (Figura 34). Essa mesma estratégia já havia sido aplicada para o promotor do bacteriófago P_L-λ e ativo em *E. coli*, resultando em uma variação da fluorescência na ordem de 196 vezes (ALPER et al., 2005). Neste caso, a variação de fluorescência foi resultado da variação no nível de transcrição do gene (NEVOIGT et al., 2006).

Após o *screening* inicial, nove cepas de *M. smegmatis*::pJK representativas da variação de fluorescência, foram selecionadas para análise por citometria de fluxo. Ao selecionarmos a população crescente de bacilos utilizando a complexidade intracelular e volume celular, excluímos eventos como restos celulares, macromoléculas do meio de cultura e grumos de bactérias – este último bastante comum em cultivos micobacterianos. Observando o histograma e revelando a intensidade da fluorescência através da mediana do valor de FITC, conseguimos distinguir 3 perfis de fluorescência, um mais intenso determinado por pJK-A6, pJK-F8, pJK-E3, pJK-A2 e pJK-B7; um mediano determinado por pJK-E6 e pJK-D6 e um menos intenso determinado por pJK-C1. Ainda há o vetor pJK-D9 que não induz fluorescência (Figura 38).

Ao longo do crescimento bacteriano a fluorescência de cada população de *M. smegmatis*::pJK se mantém relativamente constante, com uma variação próxima a D.O. de 0,5. Cronologicamente, a população de *M. smegmatis*::pJK é inoculada em meio de cultura onde há bactérias fenotipicamente distintas. Após algumas horas àquelas viáveis entram em processo de divisão celular, gerando bactérias que são inicialmente do fenótipo não fluorescente, fato responsável pela variação de fluorescência próxima a D.O. de 0,5. Após a replicação a grande parte da população de bactérias torna-se fluorescente, cuja intensidade se localiza a um determinado limite, onde cada cepa possui seu próprio limite, a exemplo de *M. smegmatis*::pJK-D6.

Devido à grande diferença nos níveis de fluorescência observados, esperava-se que a tradução da proteína eGFP e sua possível toxicidade pudessem retardar o crescimento de algumas das cepas recombinantes, porém a curva de crescimento demonstrou que tal inibição não ocorre a ponto de influenciar na densidade ótica da amostra (Figura 40). A visualização de *M. smegmatis*::pJK-D6 sob microscopia demonstra mais claramente estes fatos, onde se observa uma heterogeneidade fenotípica entre os bacilos (Figura 42).

Foi possível correlacionar claramente a capacidade dos promotores mutagenizados entre as espécies *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG na expressão de eGFP ($R^2 = 0,86$, Figura 45). Estes dados indicam que, ao menos nos promotores baseados no pL5, sua força de expressão pode ser estimada parcialmente, a exemplo dos promotores de pJKB7 e pJKC1, respectivamente, de expressão alta e baixa.

5.4 Expressão dos candidatos vacinais pelos promotores mutagenizados

Ao testarmos os vetores pJK para direcionar a expressão dos candidatos vacinais SmTSP-2 e Sm29 conseguimos detectar a expressão de Sm29 em BCG recombinante, direcionada tanto pelo promotor de pJK-C1, tido como fraco quanto pelo promotor de pJK-B7 tido como forte (Figura 46). A estratégia abordada neste trabalho mostra que é possível obter cepas de BCG recombinante capazes de expressar sequências genéticas de organismos geneticamente distantes como *Schistosoma* através da otimização dos vetores micobacterianos e/ou da sequência do gene heterólogo.

Nenhum dos vetores pJK-C1 ou pJK-B7 foi capaz de expressar a níveis detectáveis por *Western blot* o antígeno SmTSP-2 e, ainda, outro vetor tido como forte, pJK-A2, não foi capaz de induzir a expressão de Sm29. Mais uma vez, apesar do controle molecular imposto para a expressão em micobactéria destes fragmentos genéticos, utilizando-se de genes sintéticos e promotores mutagenizados, isso demonstra a existência de fatores desconhecidos ou não abordados neste trabalho que são capazes de determinar a expressão heteróloga. Há de se ressaltar que um nível de expressão heteróloga ótimo não deve ser alto a ponto de perturbar os processos metabólicos naturais da micobactéria, os quais devem ser restritivos, dado seu metabolismo lento e nem tão baixo a ponto de não estimular o sistema imune.

5.5 Imunogenicidade de rBCG-Sm29

Ao analisarmos a resposta imune induzida em animais imunizados com rBCG-Sm29, não detectamos no soro destes animais anticorpos anti-Sm29 específicos (Figura 47). Acreditamos que neste sistema de apresentação o antígeno heterólogo tenha estimulado preferencialmente a resposta imune celular. Neste sentido, alguns trabalhos de nosso laboratório também não detectaram anticorpos específicos aos antígenos heterólogos expressos nos respectivos rBCGs (NASCIMENTO et al., 2008; VARALDO et al., 2004). Contudo, outros trabalhos de nosso laboratório, demonstraram a indução de anticorpos específicos, especialmente se utilizar o efeito adjuvante de outras cepas (MAZZANTINI et al., 2004; MIYAJI et al., 2001).

O vetor pJK-B7.Sm29opt não possui em seu cassette de expressão uma sequência sinal para exportar ou direcionar o antígeno à membrana. No caso de rBCG-Sm29 não houve necessidade de direcionar geneticamente a exportação do antígeno Sm29 para estimular especificamente o sistema imune. Acreditamos que o antígeno seja contido no citoplasma do

bacilo e seu processamento ocorra somente no momento em que o bacilo inteiro seja processado no fagolisossomo. Assim, os antígenos do rBCG seriam apresentados em um contexto MHC de classe II, consequentemente estimulando células T CD4⁺. De fato, outros autores demonstraram que o direcionamento extracelular do antígeno PspA de *S. pneumoniae* e OspA de *B. burgdorferi* potencializa a resposta imune humoral (LANGERMANN et al., 1994; STOVER et al., 1993). Logo, a apresentação do antígeno heterólogo pelo rBCG poderá determinar o perfil da resposta imune induzida.

Cardoso e colaboradores (2008) demonstraram que a imunização de camundongos com a proteína rSm29 associada ao adjuvante de Freund estimula a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10. Em nossos experimentos a imunização com rBCG-Sm29 ou rSm29+Alum induziu a produção das mesmas citocinas. Dessa forma, presumimos que o antígeno Sm29 mantenha suas características imunogênicas tanto apresentado como proteína recombinante ou como BCG recombinante. A detecção de IFN- γ e TNF- α pelos animais imunizados com rBCG-Sm29 indica uma resposta imune do tipo Th1.

A imunização com rBCG-Sm29 induz uma quantidade menor das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10, quando comparada a imunização rSm29+Alum. Neste caso, acreditamos que o estímulo antigênico contínuo e prolongado, proporcionado pelo rBCG, possa apresentar o antígeno em um contexto diferente que a imunização com a proteína recombinante associada ao adjuvante de Freund ou Alum. Kremer e colaboradores (1996) demonstraram, em camundongo, a persistência do rBCG expressando Sm28GST de *S. mansoni* por até 16 semanas. Avaliando a manutenção da resposta imune, observaram que ao administrar uma 2^a dose, os níveis de anticorpos anti-Sm28GST elevaram-se e permaneceram altos até a 53^a semana.

Desenvolvida na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) e atualmente em processo de produção GMP (do inglês “*good manufacturing process*”), a proteína recombinante Sm14 purificada de *E. coli* é capaz de induzir proteção parcial em camundongos imunizados (TENDLER et al., 1996). Igualmente, o BCG recombinante expressando Sm14, desenvolvido em nosso laboratório, foi capaz de proteger parcialmente camundongos imunizados (VARALDO et al., 2004).

Por outro lado, a imunização com a proteína Sm29 recombinante purificada de *E. coli* é capaz de estimular uma resposta imune do tipo Th1 e induzir níveis de proteção da ordem de 50% (CARDOSO et al., 2008). Em nosso laboratório construímos uma cepa de rBCG expressando Sm29, e capaz de induzir uma resposta imune celular específica em camundongos. Nosso próximo passo será testar a capacidade protetora desta vacina.

O BCG é uma das vacinas mais utilizadas e seguras no mundo. Esperamos que sistemas de expressão em micobactéria mais bem regulados permitam o desenvolvimento de uma vacina de BCG multivalente, especialmente nas áreas onde há co-incidência de patologias como a tuberculose e esquistossomose.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram construídas cepas de micobactéria recombinante capazes de expressar os antígenos de *S. mansoni* propostos. Por *Western blot*, visualizamos a expressão em rBCG de SmStoLP-2 e Sm29 e em rSmeg a expressão de SmVAL-5 e SmTSP-2.

A expressão heteróloga em micobactéria recombinante das sequências nativas dos genes de *S. mansoni* é dificultada por uma série de fatores que influenciam transcrição, tradução, estabilidade do vetor e da proteína. A abordagem que permitirá a expressão de um produto pode não viabilizar a expressão de outro. Por exemplo, observamos a expressão de *smstolp-2*, o maior dos fragmentos clonados e, em sua sequência nucleotídica nativa sem otimização de códons. Logo, tamanho ou adequação de códons nem sempre são fatores determinantes.

A utilização de genes com códons otimizados para a expressão em micobactéria possibilitou a expressão de SmVAL-5 e SmTSP-2 em *M. smegmatis*, mas não em BCG. Conclui-se que a adequação do “*codon usage*” pode viabilizar a expressão dos antígenos a ponto de serem detectados por *Western blot*, entretanto a expressão destes fragmentos em *M. smegmatis* não refletirá necessariamente na expressão em BCG.

Com relação aos vetores micobacterianos utilizados, a expressão de SmStoLP-2 é detectada em *M. smegmatis* e BCG transformados com os plasmídeos (pMIP12 e pLA71) contendo *smstolp-2*. Além disso, detectou-se a expressão de SmVAL-5 e SmTSP-2 em *M. smegmatis* transformado com os plasmídeos oriundos de pMIP12, contendo os respectivos genes *smval-5opt* e *smtsp-2opt*. Consideramos que a sequência Shine-Dalgarno contida em pMIP12 influenciou positivamente a expressão em *M. smegmatis*.

As cepas de rBCG expressando SmStoLP-2 foram utilizadas na imunização de camundongos, e pudemos observar uma resposta imune específica, apesar da sua baixa intensidade – tanto na resposta celular quanto humoral.

A mutagênese randômica da sequência do promotor pL5, originou promotores capazes de expressar o gene *egfp* em diferentes níveis, dada as diferentes intensidades em fluorescência observadas nas cepas transformadas com a biblioteca de plasmídeos pJK.

A expressão de Sm29 não pode ser confirmada em BCG sob nenhuma das construções utilizando pLA71, pLA73 ou pMIP12. Contudo, ao utilizarmos os promotores pL5 mutagenizados de pJK para direcionar a expressão de Sm29, conseguimos detectar sua expressão em rBCG induzida tanto pelo promotor de pJK-B7 e quanto pelo promotor de pJK-C1 – respectivamente considerados como forte e fraco, tal qual para eGFP.

A utilização do BCG recombinante expressando Sm29 em maior quantidade foi utilizada para imunizar camundongos e demonstrou ser capaz de estimular uma resposta imune celular específica do tipo Th1. A proteção induzida por rBCG-Sm29 contra o desafio de *S. mansoni* em camundongos deverá ser avaliada.

De uma maneira geral, o trabalho evidencia os fatores que influenciam a expressão heteróloga em micobactéria recombinante, *M. smegmatis* e BCG, demonstrando algumas possibilidades de resolução, através da utilização de vetores micobacterianos distintos, genes sintéticos de códon otimizado para micobactéria e/ou promotores de “forças” distintas.

REFERÊNCIAS*

- ABADIE, V.; BADELL, E.; DOUILLARD, P.; ENSERGUEIX, D.; LEENEN, P. J.; TANGUY, M.; FIETTE, L.; SAELAND, S.; GICQUEL, B.; WINTER, N. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1843-1850, 2005.
- ABDELHAK, S.; LOUZIR, H.; TIMM, J.; BLEL, L.; BENLASFAR, Z.; LAGRANDERIE, M.; GHEORGHIU, M.; DELLAGI, K.; GICQUEL, B. Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. **Microbiology**, v. 141, pt. 7, p. 1585-1592, 1995.
- AL-ZAROUNI, M.; DALE, J. W. Expression of foreign genes in *Mycobacterium bovis* BCG strains using different promoters reveals instability of the hsp60 promoter for expression of foreign genes in *Mycobacterium bovis* BCG strains. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 82, n. 6, p. 283-291, 2002.
- ALPER, H.; FISCHER, C.; NEVOIGT, E.; STEPHANOPOULOS, G. Tuning genetic control through promoter engineering. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, n. 36, p. 12678-12683, 2005.
- AMARAL, R. S.; TAUIL, P. L.; LIMA, D. D.; ENGELS, D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 79-85, 2006.
- ANDRADE, P. M.; CHADE, D. C.; BORRA, R. C.; NASCIMENTO, I. P.; VILLANOVA, F. E.; LEITE, L. C.; ANDRADE, E.; SROUGI, M. The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen SIPT in the intravesical treatment of bladder cancer. **Urol. Oncol.**, v. 28, n. 5, p. 520-525, 2010.
- ARAMA, C.; WASEEM, S.; FERNANDEZ, C.; ASSEFAW-REDDA, Y.; YOU, L.; RODRIGUEZ, A.; RADOSEVIC, K.; GOUDSMIT, J.; KAUFMANN, S. H.; REECE, S. T.; TROYE-BLOMBERG, M. A recombinant Bacille Calmette-Guerin construct expressing the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein enhances dendritic cell activation and primes for circumsporozoite-specific memory cells in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 30, n. 37, p. 5578-5584, 2012.
- BASTOS, R. G.; BORSUK, S.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6495-6503, 2009.
- BATONI, G.; MAISETTA, G.; FLORIO, W.; FREER, G.; CAMPA, M.; SENESI, S. Analysis of the *Mycobacterium bovis* hsp60 promoter activity in recombinant *Mycobacterium avium*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 169, n. 1, p. 117-124, 1998.
- BEHR, M. A. BCG--different strains, different vaccines? **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, n. 2, p. 86-92, 2002.

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

BENEVOLO-DE-ANDRADE, T. C.; MONTEIRO-MAIA, R.; COSGROVE, C.; CASTELLO-BRANCO, L. R. BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis--review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 459-465, 2005.

BICKLE, Q. D. Radiation-attenuated schistosome vaccination--a brief historical perspective. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1621-1632, 2009.

BRASIL. Situação Epidemiológica da esquistossomose no Brasil. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1551>. Acesso em: 17 jun. 2011.

BRASIL. Casos confirmados de Esquistossomose. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/serie_historica_esquistossomose_07_08_2012.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2013.

BRENNAN, M. J.; THOLE, J. Tuberculosis vaccines: a strategic blueprint for the next decade. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 92 Suppl 1, p. S6-13, 2012.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; FRIGUI, W.; VALENTI, P.; DOS SANTOS, S.; DUTHOY, S.; LACROIX, C.; GARCIA-PELAYO, C.; INWALD, J. K.; GOLBY, P.; GARCIA, J. N.; HEWINSON, R. G.; BEHR, M. A.; QUAIL, M. A.; CHURCHER, C.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J.; COLE, S. T. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, n. 13, p. 5596-5601, 2007.

C.D.C. Schistosomiasis. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>>. Acesso em: 4 mai. 2012.

CALMETTE, A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. **Proc. R. Soc. Med.**, v. 24, n. 11, p. 1481-1490, 1931.

CARDOSO, F. C.; PACIFICO, R. N.; MORTARA, R. A.; OLIVEIRA, S. C. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 144, n. 3, p. 382-391, 2006a.

CARDOSO, F. C.; PINHO, J. M.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. Identification of a new *Schistosoma mansoni* membrane-bound protein through bioinformatic analysis. **Genet. Mol. Res.**, v. 5, n. 4, p. 609-618, 2006b.

CARDOSO, F. C.; MACEDO, G. C.; GAVA, E.; KITTEN, G. T.; MATI, V. L.; DE MELO, A. L.; CALIARI, M. V.; ALMEIDA, G. T.; VENANCIO, T. M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; OLIVEIRA, S. C. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 10, p. e308, 2008.

CHALMERS, I. W.; MCARDLE, A. J.; COULSON, R. M.; WAGNER, M. A.; SCHMID, R.; HIRAI, H.; HOFFMANN, K. F. Developmentally regulated expression, alternative splicing and distinct sub-groupings in members of the *Schistosoma mansoni* venom allergen-like (SmVAL) gene family. **BMC Genomics**, v. 9, p. 89, 2008.

CHAMBERS, M. A.; MARSHALL, B. G.; WANGOO, A.; BUNE, A.; COOK, H. T.; SHAW, R. J.; YOUNG, D. B. Differential responses to challenge with live and dead *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. **J. Immunol.**, v. 158, n. 4, p. 1742-1748, 1997.

CHEN, P.; GOMEZ, J.; BISHAI, W. **Mycobacterial Transcription Regularion in Stationary Phase**. Washington, D.C.: ASM Press, 2000. 363 p. (Molecular Genetics of Mycobacteria)

CONNELL, N. D.; MEDINA-ACOSTA, E.; MCMASTER, W. R.; BLOOM, B. R.; RUSSELL, D. G. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, n. 24, p. 11473-11477, 1993.

CONRADT, P.; HESS, J.; KAUFMANN, S. H. Cytolytic T-cell responses to human dendritic cells and macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG and recombinant BCG secreting listeriolysin. **Microbes Infect.**, v. 1, n. 10, p. 753-764, 1999.

COOPER, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 393-422, 2009.

COULSON, P. S.; WILSON, R. A. Recruitment of lymphocytes to the lung through vaccination enhances the immunity of mice exposed to irradiated schistosomes. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 1, p. 42-48, 1997.

DANIEL, T. M. Leon Charles Albert Calmette and BCG vaccine. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 9, n. 9, p. 944-945, 2005.

DELLAGOSTIN, O. A.; ESPOSITO, G.; EALES, L. J.; DALE, J. W.; MCFADDEN, J. Activity of mycobacterial promoters during intracellular and extracellular growth. **Microbiology**, v. 141, pt. 8, p. 1785-1792, 1995.

DENNEHY, M.; WILLIAMSON, A. L. Factors influencing the immune response to foreign antigen expressed in recombinant BCG vaccines. **Vaccine**, v. 23, n. 10, p. 1209-1224, 2005.

DESEL, C.; DORHOI, A.; BANDERMANN, S.; GRODE, L.; EISELE, B.; KAUFMANN, S. H. Recombinant BCG DeltaureC hly+ induces superior protection over parental BCG by stimulating a balanced combination of type 1 and type 17 cytokine responses. **J. Infect. Dis.**, v. 204, n. 10, p. 1573-1584, 2011.

DEVULDER, G.; PEROUSE DE MONTCLOS, M.; FLANDROIS, J. P. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 55, pt. 1, p. 293-302, 2005.

DILLON, G. P.; ILLES, J. C.; ISAACS, H. V.; WILSON, R. A. Patterns of gene expression in schistosomes: localization by whole mount in situ hybridization. **Parasitology**, v. 134, pt. 11, p. 1589-1597, 2007.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, n. 6, p. 659-667, 2008.

EDELMAN, R.; PALMER, K.; RUSS, K. G.; SECREST, H. P.; BECKER, J. A.; BODISON, S. A.; PERRY, J. G.; SILLS, A. R.; BARBOUR, A. G.; LUKE, C. J.; HANSON, M. S.; STOVER, C. K.; BURLEIN, J. E.; BANSAL, G. P.; CONNOR, E. M.; KOENIG, S. Safety and immunogenicity of recombinant Bacille Calmette-Guerin (rBCG) expressing *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) lipoprotein in adult volunteers: a candidate Lyme disease vaccine. **Vaccine**, v. 17, n. 7-8, p. 904-914, 1999.

FARIAS, L. P.; CARDOSO, F. C.; MIYASATO, P. A.; MONTTOYA, B. O.; TARARAM, C. A.; ROFFATO, H. K.; KAWANO, T.; GAZZINELLI, A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COULSON, P. S.; WILSON, R. A.; OLIVEIRA, S. C.; LEITE, L. C. *Schistosoma mansoni* Stomatin like protein-2 is located in the tegument and induces partial protection against challenge infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 2, p. e597, 2010.

FARIAS, L. P.; RODRIGUES, D.; CUNNA, V.; ROFATTO, H. K.; FAQUIM-MAURO, E. L.; LEITE, L. C. *Schistosoma mansoni* venom allergen like proteins present differential allergic responses in a murine model of airway inflammation. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 2, p. e1510, 2012.

FORTIER, A. H.; MOCK, B. A.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against cutaneous and systemic *Leishmania major* infections of mice. **Infect. Immun.**, v. 55, n. 7, p. 1707-1714, 1987.

FULTON, S. A.; MARTIN, T. D.; REDLINE, R. W.; HENRY BOOM, W. Pulmonary immune responses during primary *mycobacterium bovis*- Calmette-Guerin bacillus infection in C57Bl/6 mice. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 22, n. 3, p. 333-343, 2000.

GENEDB. The *Schistosoma mansoni* homepage on GeneDB. Disponível em: <<http://www.genedb.org/Homepage/Smansoni>>. Acesso em: 10 ago. 2012.

GOMES, L. H.; OTTO, T. D.; VASCONCELLOS, E. A.; FERRAO, P. M.; MAIA, R. M.; MOREIRA, A. S.; FERREIRA, M. A.; CASTELLO-BRANCO, L. R.; DEGRAVE, W. M.; MENDONCA-LIMA, L. Genome sequence of *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, the Brazilian vaccine strain against tuberculosis. **J. Bacteriol.**, v. 193, n. 19, p. 5600-5601, 2011.

GREENBERG, R. M. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? **Int. J. Parasitol.**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 2005.

GRIFFIN, S.; WILLIAMSON, A. L.; CHAPMAN, R. Optimisation of a mycobacterial replicon increases foreign antigen expression in mycobacteria. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 89, n. 3, p. 225-232, 2009.

GRODE, L.; SEILER, P.; BAUMANN, S.; HESS, J.; BRINKMANN, V.; NASSER EDDINE, A.; MANN, P.; GOOSMANN, C.; BANDERMANN, S.; SMITH, D.; BANCROFT, G. J.; REYRAT, J. M.; VAN SOOLINGEN, D.; RAUPACH, B.; KAUFMANN, S. H. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant

Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 9, p. 2472-2479, 2005.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

GUSTAFSSON, C.; MINSHULL, J.; GOVINDARAJAN, S.; NESS, J.; VILLALOBOS, A.; WELCH, M. Engineering genes for predictable protein expression. **Protein Expr. Purif.**, v. 83, n. 1, p. 37-46, 2012.

HAESELEER, F.; POLLET, J. F.; HAUMONT, M.; BOLLEN, A.; JACOBS, P. Stable integration and expression of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein coding sequence in mycobacteria. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 57, n. 1, p. 117-126, 1993.

HAYASHI, D.; TAKII, T.; FUJIWARA, N.; FUJITA, Y.; YANO, I.; YAMAMOTO, S.; KONDO, M.; YASUDA, E.; INAGAKI, E.; KANAI, K.; FUJIWARA, A.; KAWARAZAKI, A.; CHIBA, T.; ONOZAKI, K. Comparable studies of immunostimulating activities in vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) substrains. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 56, n. 2, p. 116-128, 2009.

HESS, J.; MIKO, D.; CATIC, A.; LEHMENSIEK, V.; RUSSELL, D. G.; KAUFMANN, S. H. *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 9, p. 5299-5304, 1998.

HEWITSON, J. P.; HAMBLIN, P. A.; MOUNTFORD, A. P. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. **Parasite Immunol.**, v. 27, n. 7-8, p. 271-280, 2005.

HOFFMANN, K. F.; JAMES, S. L.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.**, v. 163, n. 2, p. 927-938, 1999.

HOTEZ, P. J.; FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; MOLYNEUX, D. H. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 373, n. 9674, p. 1570-1575, 2009.

HOTEZ, P. J.; FENWICK, A. Schistosomiasis in Africa: an emerging tragedy in our new global health decade. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, n. 9, p. e485, 2009.

HOUBEN, D.; DEMANGEL, C.; VAN INGEN, J.; PEREZ, J.; BALDEON, L.; ABDALLAH, A. M.; CALEECHURN, L.; BOTTAI, D.; VAN ZON, M.; DE PUNDER, K.; VAN DER LAAN, T.; KANT, A.; BOSSERS-DE VRIES, R.; WILLEMSSEN, P.; BITTER, W.; VAN SOOLINGEN, D.; BROSCHE, R.; VAN DER WEL, N.; PETERS, P. J. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. **Cell Microbiol.**, v. 14, n. 8, p. 1287-1298, 2012.

HSU, T.; HINGLEY-WILSON, S. M.; CHEN, B.; CHEN, M.; DAI, A. Z.; MORIN, P. M.; MARKS, C. B.; PADIYAR, J.; GOULDING, C.; GINGERY, M.; EISENBERG, D.; RUSSELL, R. G.; DERRICK, S. C.; COLLINS, F. M.; MORRIS, S. L.; KING, C. H.;

JACOBS, W. R., JR. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 21, p. 12420-12425, 2003.

HUFF, J.; CZYZ, A.; LANDICK, R.; NIEDERWEIS, M. Taking phage integration to the next level as a genetic tool for mycobacteria. **Gene**, v. 468, n. 1-2, p. 8-19, 2010.

JACOBS, W. R., JR.; TUCKMAN, M.; BLOOM, B. R. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 532-535, 1987.

JACOBS, W. R., JR.; SNAPPER, S. B.; LUGOSI, L.; JEKKEL, A.; MELTON, R. E.; KIESER, T.; BLOOM, B. R. Development of genetic systems for the mycobacteria. **Acta Leprol.**, v. 7 Suppl 1, p. 203-207, 1989.

JAMES, S. L.; PEARCE, E. J.; SHER, A. Prospects for a nonliving vaccine against schistosomiasis based on cell-mediated immune resistance mechanisms. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82 Suppl 4, p. 121-123, 1987.

JAMES, S. L.; PEARCE, E. J. The influence of adjuvant on induction of protective immunity by a non-living vaccine against schistosomiasis. **J. Immunol.**, v. 140, n. 8, p. 2753-2759, 1988.

KANEKIYO, M.; MATSUO, K.; HAMATAKE, M.; HAMANO, T.; OHSU, T.; MATSUMOTO, S.; YAMADA, T.; YAMAZAKI, S.; HASEGAWA, A.; YAMAMOTO, N.; HONDA, M. Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin expressing human immunodeficiency virus type 1 Gag. **J. Virol.**, v. 79, n. 14, p. 8716-8723, 2005.

KAROLCHIK, D.; BAERTSCH, R.; DIEKHANS, M.; FUREY, T. S.; HINRICHS, A.; LU, Y. T.; ROSKIN, K. M.; SCHWARTZ, M.; SUGNET, C. W.; THOMAS, D. J.; WEBER, R. J.; HAUSSLER, D.; KENT, W. J. The UCSC Genome Browser Database. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, n. 1, p. 51-54, 2003.

KAVEH, D. A.; BACHY, V. S.; HEWINSON, R. G.; HOGARTH, P. J. Systemic BCG immunization induces persistent lung mucosal multifunctional CD4 T(EM) cells which expand following virulent mycobacterial challenge. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21566, 2011.

KAWAI, K.; MIYAZAKI, J.; JORAKU, A.; NISHIYAMA, H.; AKAZA, H. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. **Cancer Sci.**, v. 104, n. 1, p. 22-27, 2013.

KHALIL, E. A.; MUSA, A. M.; MODABBER, F.; EL-HASSAN, A. M. Safety and immunogenicity of a candidate vaccine for visceral leishmaniasis (Alum-precipitated autoclaved Leishmania major + BCG) in children: an extended phase II study. **Ann. Trop. Paediatr.**, v. 26, n. 4, p. 357-361, 2006.

KIM, J. C.; STEINBERG, G. D. The limits of bacillus Calmette-Guerin for carcinoma in situ of the bladder. **J. Urol.**, v. 165, n. 3, p. 745-756, 2001.

KOZAK, R.; BEHR, M. A. Divergence of immunologic and protective responses of different BCG strains in a murine model. **Vaccine**, v. 29, n. 7, p. 1519-1526, 2011.

KREMER, L.; RIVEAU, G.; BAULARD, A.; CAPRON, A.; LOCHT, C. Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant bacillus Calmette-Guerin producing the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. **J. Immunol.**, v. 156, n. 11, p. 4309-4317, 1996.

KREMER, L.; DUPRE, L.; RIVEAU, G.; CAPRON, A.; LOCHT, C. Systemic and mucosal immune responses after intranasal administration of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin expressing glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 12, p. 5669-5676, 1998.

LAGRANDERIE, M.; MURRAY, A.; GICQUEL, B.; LECLERC, C.; GHEORGHIU, M. Oral immunization with recombinant BCG induces cellular and humoral immune responses against the foreign antigen. **Vaccine**, v. 11, n. 13, p. 1283-1290, 1993.

LAGRANDERIE, M.; BALAZUC, A. M.; GICQUEL, B.; GHEORGHIU, M. Oral immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG simian immunodeficiency virus nef induces local and systemic cytotoxic T-lymphocyte responses in mice. **J. Virol.**, v. 71, n. 3, p. 2303-2309, 1997a.

LAGRANDERIE, M.; LO-MAN, R.; DERIAUD, E.; GICQUEL, B.; GHEORGHIU, M.; LECLERC, C. Genetic control of antibody responses induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing a foreign antigen. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 8, p. 3057-3064, 1997b.

LALOR, M. K.; SMITH, S. G.; FLOYD, S.; GORAK-STOLINSKA, P.; WEIR, R. E.; BLITZ, R.; BRANSON, K.; FINE, P. E.; DOCKRELL, H. M. Complex cytokine profiles induced by BCG vaccination in UK infants. **Vaccine**, v. 28, n. 6, p. 1635-1641, 2010.

LANGERMANN, S.; PALASZYNSKI, S. R.; BURLEIN, J. E.; KOENIG, S.; HANSON, M. S.; BRILES, D. E.; STOVER, C. K. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. 6, p. 2277-2286, 1994.

LE DANTEC, C.; WINTER, N.; GICQUEL, B.; VINCENT, V.; PICARDEAU, M. Genomic sequence and transcriptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid: evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 7, p. 2157-2164, 2001.

LEVERSEN, N. A.; SVILAND, L.; WIKER, H. G.; MUSTAFA, T. Long-term persistence of BCG Pasteur in lungs of C57BL/6 mice following intranasal infection. **Scand. J. Immunol.**, v. 75, n. 5, p. 489-499, 2012.

LIM, E. M.; RAUZIER, J.; TIMM, J.; TORREA, G.; MURRAY, A.; GICQUEL, B.; PORTNOI, D. Identification of mycobacterium tuberculosis DNA sequences encoding exported proteins by using *phoA* gene fusions. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 1, p. 59-65, 1995.

LOUKAS, A.; TRAN, M.; PEARSON, M. S. Schistosome membrane proteins as vaccines. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, n. 3-4, p. 257-263, 2007.

LUO, Y.; YAMADA, H.; CHEN, X.; RYAN, A. A.; EVANOFF, D. P.; TRICCAS, J. A.; O'DONNELL, M. A. Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) expressing mouse IL-18 augments Th1 immunity and macrophage cytotoxicity. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 137, n. 1, p. 24-34, 2004.

LUO, Y.; HENNING, J.; O'DONNELL, M. A. Th1 cytokine-secreting recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin and prospective use in immunotherapy of bladder cancer. **Clin. Dev. Immunol.**, 2011, p. 728930, 2011.

MAZZANTINI, R. P.; MIYAJI, E. N.; DIAS, W. O.; SAKAUCHI, D.; NASCIMENTO, A. L.; RAW, I.; WINTER, N.; GICQUEL, B.; RAPPUOLI, R.; LEITE, L. C. Adjuvant activity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing CRM197 on the immune response induced by BCG expressing tetanus toxin fragment C. **Vaccine**, v. 22, n. 5-6, p. 740-746, 2004.

MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 1, p. 225-242, 2008.

MIYAJI, E. N.; MAZZANTINI, R. P.; DIAS, W. O.; NASCIMENTO, A. L.; MARCOVISTZ, R.; MATOS, D. S.; RAW, I.; WINTER, N.; GICQUEL, B.; RAPPUOLI, R.; LEITE, L. C. Induction of neutralizing antibodies against diphtheria toxin by priming with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing CRM(197), a mutant diphtheria toxin. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 2, p. 869-874, 2001.

NAKAMURA, Y.; GOJOBORI, T.; IKEMURA, T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 292, 2000.

NASCIMENTO, I. P.; DIAS, W. O.; MAZZANTINI, R. P.; MIYAJI, E. N.; GAMBERINI, M.; QUINTILIO, W.; GEBARA, V. C.; CARDOSO, D. F.; HO, P. L.; RAW, I.; WINTER, N.; GICQUEL, B.; RAPPUOLI, R.; LEITE, L. C. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 9, p. 4877-4883, 2000.

NASCIMENTO, I. P.; DIAS, W. O.; QUINTILIO, W.; CHRIST, A. P.; MORAES, J. F.; VANCETTO, M. D.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; RAW, I.; LEITE, L. C. Neonatal immunization with a single dose of recombinant BCG expressing subunit S1 from pertussis toxin induces complete protection against *Bordetella pertussis* intracerebral challenge. **Microbes Infect.**, v. 10, n. 2, p. 198-202, 2008.

NEVOIGT, E.; KOHNKE, J.; FISCHER, C. R.; ALPER, H.; STAHL, U.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering of promoter replacement cassettes for fine-tuning of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 8, p. 5266-5273, 2006.

NURUL, A. A.; RAPEAH, S.; NORAZMI, M. N. Plasmodium falciparum 19 kDa of merozoite surface protein-1 (MSP-1(19)) expressed in *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guerin (BCG) is reactive with an inhibitory but not a blocking monoclonal antibody. **Trop. Biomed.**, v. 27, n. 1, p. 60-67, 2010.

O'DONNELL, M. A.; ALDOVINI, A.; DUDA, R. B.; YANG, H.; SZILVASI, A.; YOUNG, R. A.; DEWOLF, W. C. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG secreting functional interleukin-2 enhances gamma interferon production by splenocytes. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 6, p. 2508-2514, 1994.

OHARA, N.; YAMADA, T. Recombinant BCG vaccines. **Vaccine**, v. 19, n. 30, p. 4089-4098, 2001.

OLIVEIRA, S. C.; FONSECA, C. T.; CARDOSO, F. C.; FARIAS, L. P.; LEITE, L. C. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. **Acta Trop.**, v. 108, n. 2-3, p. 256-262, 2008.

OZEKI, Y.; HIRAYAMA, Y.; TAKII, T.; YAMAMOTO, S.; KOBAYASHI, K.; MATSUMOTO, S. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. **Vaccine**, v. 29, n. 40, p. 6881-6887, 2011.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.

PIERI, O. S.; FAVRE, T. C. Incrementando o Programa de Controle da Esquistossomose. **Cad. Saude Publica**, v. 23, p. 1733-1734, 2007.

PYM, A. S.; BRODIN, P.; MAJLESSI, L.; BROSCHE, R.; DEMANGEL, C.; WILLIAMS, A.; GRIFFITHS, K. E.; MARCHAL, G.; LECLERC, C.; COLE, S. T. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. **Nat. Med.**, v. 9, n. 5, p. 533-539, 2003.

REYRAT, J. M.; BERTHET, F. X.; GICQUEL, B. The urease locus of *Mycobacterium tuberculosis* and its utilization for the demonstration of allelic exchange in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 92, n. 19, p. 8768-8772, 1995.

ROSS, A. G.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C.; OLDS, G. R.; LI, Y.; WILLIAMS, G. M.; MCMANUS, D. P. Schistosomiasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, n. 16, p. 1212-1220, 2002.

SABLE, S. B.; CHERUVU, M.; NANDAKUMAR, S.; SHARMA, S.; BANDYOPADHYAY, K.; KELLAR, K. L.; POSEY, J. E.; PLIKAYTIS, B. B.; AMARA, R. R.; SHINNICK, T. M. Cellular immune responses to nine *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates following intranasal vaccination. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22718, 2011.

SAXENA, R. K.; WEISSMAN, D.; SIMPSON, J.; LEWIS, D. M. Murine model of BCG lung infection: dynamics of lymphocyte subpopulations in lung interstitium and tracheal lymph nodes. **J. Biosci.**, v. 27, n. 2, p. 143-153, 2002.

SHELLEY, M. D.; COURT, J. B.; KYNASTON, H.; WILT, T. J.; FISH, R. G.; MASON, M. Intravesical Bacillus Calmette-Guerin in Ta and T1 Bladder Cancer. **Cochrane. Database. Syst. Rev.**, n. 4, p. CD001986, 2000.

SIDDIQUI, A. A.; AHMAD, G.; DAMIAN, R. T.; KENNEDY, R. C. Experimental vaccines in animal models for schistosomiasis. **Parasitol. Res.**, v. 102, n. 5, p. 825-833, 2008.

SLOBBE, L.; LOCKHART, E.; O'DONNELL, M. A.; MACKINTOSH, C.; DE LISLE, G.; BUCHAN, G. An in vivo comparison of bacillus Calmette-Guerin (BCG) and cytokine-secreting BCG vaccines. **Immunology**, v. 96, n. 4, p. 517-523, 1999.

SNAPPER, S. B.; LUGOSI, L.; JEKKEL, A.; MELTON, R. E.; KIESER, T.; BLOOM, B. R.; JACOBS, W. R., JR. Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 85, n. 18, p. 6987-6991, 1988.

SPRATT, J. M.; RYAN, A. A.; BRITTON, W. J.; TRICCAS, J. A. Epitope-tagging vectors for the expression and detection of recombinant proteins in mycobacteria. **Plasmid**, v. 53, n. 3, p. 269-273, 2005.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect. Dis.**, v. 6, n. 7, p. 411-425, 2006.

STOVER, C. K.; DE LA CRUZ, V. F.; FUERST, T. R.; BURLEIN, J. E.; BENSON, L. A.; BENNETT, L. T.; BANSAL, G. P.; YOUNG, J. F.; LEE, M. H.; HATFULL, G. F.; ET AL. New use of BCG for recombinant vaccines. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 456-460, 1991.

STOVER, C. K.; BANSAL, G. P.; HANSON, M. S.; BURLEIN, J. E.; PALASZYNSKI, S. R.; YOUNG, J. F.; KOENIG, S.; YOUNG, D. B.; SADZIENE, A.; BARBOUR, A. G. Protective immunity elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 1, p. 197-209, 1993.

SUN, R.; SKEIKY, Y. A.; IZZO, A.; DHEENADHAYALAN, V.; IMAM, Z.; PENN, E.; STAGLIANO, K.; HADDOCK, S.; MUELLER, S.; FULKERSON, J.; SCANGA, C.; GROVER, A.; DERRICK, S. C.; MORRIS, S.; HONE, D. M.; HORWITZ, M. A.; KAUFMANN, S. H.; SADOFF, J. C. Novel recombinant BCG expressing perfringolysin O and the over-expression of key immunodominant antigens; pre-clinical characterization, safety and protection against challenge with Mycobacterium tuberculosis. **Vaccine**, v. 27, n. 33, p. 4412-4423, 2009.

SUPPLY, P.; SUTTON, P.; COUGHLAN, S. N.; BILO, K.; SAMAN, E.; TREES, A. J.; CESBRON DELAUW, M. F.; LOCHT, C. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from Toxoplasma gondii. **Vaccine**, v. 17, n. 7-8, p. 705-714, 1999.

SWEENEY, K. A.; DAO, D. N.; GOLDBERG, M. F.; HSU, T.; VENKATASWAMY, M. M.; HENAO-TAMAYO, M.; ORDWAY, D.; SELLERS, R. S.; JAIN, P.; CHEN, B.; CHEN, M.; KIM, J.; LUKOSE, R.; CHAN, J.; ORME, I. M.; PORCELLI, S. A.; JACOBS, W. R., JR. A recombinant Mycobacterium smegmatis induces potent bactericidal immunity against Mycobacterium tuberculosis. **Nat. Med.**, v. 17, n. 10, p. 1261-1268, 2011.

TENDLER, M.; BRITO, C. A.; VILAR, M. M.; SERRA-FREIRE, N.; DIOGO, C. M.; ALMEIDA, M. S.; DELBEM, A. C.; DA SILVA, J. F.; SAVINO, W.; GARRATT, R. C.; KATZ, N.; SIMPSON, A. S. A Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein, Sm14, is the

potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, n. 1, p. 269-273, 1996.

TRAN, M. H.; PEARSON, M. S.; BETHONY, J. M.; SMYTH, D. J.; JONES, M. K.; DUKE, M.; DON, T. A.; MCMANUS, D. P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; LOUKAS, A. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. **Nat. Med.**, v. 12, n. 7, p. 835-840, 2006.

TRAN, M. H.; FREITAS, T. C.; COOPER, L.; GAZE, S.; GATTON, M. L.; JONES, M. K.; LOVAS, E.; PEARCE, E. J.; LOUKAS, A. Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 4, p. e1000840, 2010.

TURNER, J.; DOCKRELL, H. M. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8⁺ T cells in vitro. **Immunology**, v. 87, n. 3, p. 339-342, 1996.

VAN DER WERF, M. J.; DE VLAS, S. J.; BROOKER, S.; LOOMAN, C. W.; NAGELKERKE, N. J.; HABBEMA, J. D.; ENGELS, D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Trop.**, v. 86, n. 2-3, p. 125-139, 2003.

VARALDO, P. B.; LEITE, L. C.; DIAS, W. O.; MIYAJI, E. N.; TORRES, F. I.; GEBARA, V. C.; ARMOA, G. R.; CAMPOS, A. S.; MATOS, D. C.; WINTER, N.; GICQUEL, B.; VILAR, M. M.; MCFADDEN, J.; ALMEIDA, M. S.; TENDLER, M.; MCINTOSH, D. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 6, p. 3336-3343, 2004.

VARALDO, P. B.; MIYAJI, E. N.; VILAR, M. M.; CAMPOS, A. S.; DIAS, W. O.; ARMOA, G. R.; TENDLER, M.; LEITE, L. C.; MCINTOSH, D. Mycobacterial codon optimization of the gene encoding the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* in recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin enhances protein expression but not protection against cercarial challenge in mice. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 132-139, 2006.

W.H.O. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/. Acesso em: 10 mai. 2012

W.H.O. Infectious Diseases. Disponível em: http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/. Acesso em: 14 ago. 2012.

WAAGMEESTER, A.; THOMPSON, J.; REYRAT, J. M. Identifying sigma factors in *Mycobacterium smegmatis* by comparative genomic analysis. **Trends Microbiol.**, v. 13, n. 11, p. 505-509, 2005.

WANG, H.; LIU, Q.; LIU, K.; ZHONG, W.; GAO, S.; JIANG, L.; AN, N. Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing ROP2 gene of *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Int.**, v. 56, n. 4, p. 263-268, 2007.

WILKINS, M. R.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods Mol. Biol.**, v. 112, p. 531-552, 1999.

WILSON, R. A. T cell derived cytokines in lung-phase immunity to *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87 Suppl 4, p. 105-109, 1992.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Schistosome vaccines: a critical appraisal. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 13-20, 2006.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. **Trends Parasitol.**, v. 25, n. 9, p. 423-431, 2009.

WYNN, T. A.; JANKOVIC, D.; HIENY, S.; CHEEVER, A. W.; SHER, A. IL-12 enhances vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in mice and decreases T helper 2 cytokine expression, IgE production, and tissue eosinophilia. **J. Immunol.**, v. 154, n. 9, p. 4701-4709, 1995.

YAMADA, H.; MATSUMOTO, S.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, T.; YAMASHITA, U. Murine IL-2 secreting recombinant *Bacillus Calmette-Guerin* augments macrophage-mediated cytotoxicity against murine bladder cancer MBT-2. **J. Urol.**, v. 164, n. 2, p. 526-531, 2000.

YOUNG, S. L.; O'DONNELL, M. A.; BUCHAN, G. S. IL-2-secreting recombinant bacillus Calmette Guerin can overcome a Type 2 immune response and corticosteroid-induced immunosuppression to elicit a Type 1 immune response. **Int. Immunol.**, v. 14, n. 7, p. 793-800, 2002.

YU, J. S.; PEACOCK, J. W.; VANLEEUEWEN, S.; HSU, T.; JACOBS, W. R., JR.; CAYABYAB, M. J.; LETVIN, N. L.; FROTHINGHAM, R.; STAATS, H. F.; LIAO, H. X.; HAYNES, B. F. Generation of mucosal anti-human immunodeficiency virus type 1 T-cell responses by recombinant *Mycobacterium smegmatis*. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 13, n. 11, p. 1204-1211, 2006.

ZACCOLO, M.; WILLIAMS, D. M.; BROWN, D. M.; GHERARDI, E. An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues. **J. Mol. Biol.**, v. 255, n. 4, p. 589-603, 1996.

ZHENG, C.; XIE, P.; CHEN, Y. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* FCC-1/HN strain induces strong immune responses in BALB/c mice. **Parasitol. Int.**, v. 51, n. 1, p. 1-7, 2002.

APÊNDICE A – Sequência nucleotídica dos fragmentos amplificados, características e oligonucleotídeos diretos e reversos utilizados

Identificação do gene amplificado	Tamanho do amplicon (pb)	% Conteúdo GC	Massa molecular predita (kDa)
Vetor micobacteriano	Oligonucleotídeos diretos e reversos		
Sequência nucleotídica amplificada			
<i>smstolp-2</i>	1077 pb	GC = 39,9%	39,5 kDa
pLA71 e pLA73	Direto 5´ – TTC <u>GGTACC</u> G ATT CGT AGT ATC ATT GGT CGT TCA – 3´ Reverso 5´ – TTC <u>GCGGCCGC</u> CTA TTC TTG TTT ATC GCT ATC ATT – 3´		
pMIP12	Direto 5´ – TTC <u>GGATCC</u> ATT CGT AGT ATC ATT GGT CGT TCA – 3´ Reverso 5´ – TTC <u>CTGCAG</u> CTA TTC TTG TTT ATC GCT ATC ATT – 3´		
5´ATGATTCGTAGTATCATTGGTCGTTCAAGTTGTCGACTTTCCAGGGTATATGCTAGCAGTCGTGACTACACATCACAAGCACCCATAAATTTAGGGGTATTGATCGTTCCAGAGAAAGAAGCTTGGGTTATTGAAAGGTTAGGAAAATTTACAGGACGCTGGAACCAGGACTCAATTTTTGTATACCCATTCTAGATCGCGTCGCTTATGTACAGTCATTGAAAGAAGTGGCCATTGAAATTCCAGATCAGTCTGCCATTACCTCAGATAATGTCGTTTTACAATTGAACGGTGTTCTCTTCCTTAAAGTCAAAAATCCTTATTTAGCATCATATGGGGTGTCCGAGGCTGAATTTGCAATTACTCAGTTAGCTCAAACAATTATGCGATCAGAAATCGGGAAGATAATTCTGGACAATGTTTTTAAAGAACGA GAAGCATTAAATTTTCAAATCGTACAAGCTTTAGGCAAAGCATCAGAACCTTGGGGTATTGAGTGTTTGCGTTATGAAATTCGCGATGTCCAGGTGCCACAAAAAATCAAAGAAGCTATGCAAATGCAAGTCGAAGCAGAACGAAAAAACGTGCATCCATTTTAGAGTCGGAAGGACAACGTGAGGCTGCTATTAATCGAGCTGAGGGTTTAAACGTAGCCAGGTATTAGAGTCAGAGGGTCACCAGATTGAAATTGTAAATAAAGCTTCAGGTGAAGCTGAAGCTATCCAACGTCTAGCAGAAGCTCGAGCTCAGTCTATTCAAATCATTGCCCCGTGCGATCGGTAGTAAGCGTGGAGCAGATGCAGTACAGCTTACAGTAGCTGAACAGTACATAGAAGCTTTCAGTGCTTTAGCGAAGACAACATAATACAGTGTTATTACCATCTCATAGTGGTGATGTTGCGTCGATGGTTACTCAAGCA TTGACTATATTTAAAAGTTTAGATCAACCGAAAACCGACATCGGTAATGATAATAATGACGGTGGATGTAATGATGAATCTCATTGAGAAGTAGTGGCTGACCATCAGTCAAATCCCAATATTATTAATAATAATGATAGCGATAAACAAGAATAG – 3´			

Identificação do gene amplificado	Tamanho do amplicon (pb)	% Conteúdo GC	Massa molecular predita (kDa)
Vetor micobacteriano	Oligonucleotídeos diretos e reversos		
Sequência nucleotídica amplificada			
sm29	393 pb	GC = 36,9%	14 kDa
pLA71 e pLA73	Direto 5´ – TTC <u>GGTACC</u> G AGC GTA TCA ATA TCA GAA GAG AAC – 3´ Reverso 5´ – TTC <u>GCGGCCGC</u> TCA TTT TGT CAT TCC GTT ACA TAG ATC – 3´		
pMIP12	Direto 5´ – TTC <u>GGATCC</u> AGC GTA TCA ATA TCA GAA GAG AAC – 3´ Reverso 5´– TTC <u>CTGCAG</u> TCA TTT TGT CAT TCC GTT ACA TAG ATC – 3´		
5´AGCGTATCAATATCAGAAGAGAACAACACTGTACATCTTGCTCAACGGCTGGTTA TAATTATTTCGATTTCACAGAATATGCGTGTTTAAGGATGGCATACCCATTAACCTC CCAAACGAAAATCGAACGCAGTGTAACACTGATTTGTGTAACGGGTAAACAGTT GATAACACTGGAAAAATTCCATCAGTTCCTATAGCAAATCCATTTTCGTTGCTATA CGTGTTTGAATTGTACAAAAAGTAACCAAAAGGTACTTAGCGGTTGTGGTGCA GTGTGACAACCTCGTGGTTCTGGAATTATCAGTAAATTTTGTGGAACCTACATGTGA AAGATTGTATATTGACGATCAAATTAGTTGTTGCTCAACAGATCTATGTAACGGA ATGACAAAA – 3´			
sm29opt	393 pb	GC = 50,4%	14 kDa
pLA71	Direto 5´ – TAG <u>GGTACC</u> G AGC GTC AGC ATT TCC GAA GAG – 3´ Reverso 5´ – TAG <u>GCGGCCGC</u> TTA CTT GGT CAT ACC ATT GCA CAG – 3´		
pMIP12	Direto 5´ – TAG <u>GGATCC</u> GAG AAA CCG AAA GTG AAA AAC CAC – 3´ Reverso 5´ – TAG <u>CTGCAG</u> TTA ATG TGC CTT GCT CAG GTC GCT – 3´		
5´AGCGTCAGCATTTCGAAGAGAACAACACTGCACGTCGTGCTCTACTGCCGGCTA CAATTACAGCATTACCGTATCTGCGTGTTCAAAGATGGTATTCCGATCAATTTC CCGAACGAAAACCGTACCCAGTGCAACACGGACCTGTGTAACGGTCTGACGGTC GATAACACGGGTAAAGATCCCGAGCGTTCCGATCGCGAATCCATTTTCGCTGCTAT ACCTGTCTGAATTGTACCAAATCCAATCAAAAAGTTCTGAGCGGTTGTGGCGCA TGTGTGACGACCCGCGGTAGCGGCATCATTAGCAAGTTTTGCGGCACCACTGC GAGCGTTTGTATATCGACGATCAGATTAGCTGCTGTAGCACCGACCTGTGCAAT GGTATGACCAAGTAA – 3´			

Identificação do gene amplificado	Tamanho do amplicon (pb)	% Conteúdo GC	Massa molecular predita (kDa)
Vetor micobacteriano	Oligonucleotídeos diretos e reversos		
Sequência nucleotídica amplificada			
<i>smval-4</i>	480 pb	GC = 39%	18,5 kDa
pLA71 e pLA73	Direto 5´ – TAG <u>GGTACC</u> GAA GCT TAG TGA AGG TCA ACG TGC T – 3´ Reverso 5´ – TAG <u>GCGGCCGC</u> TTA GGA TTT GTT ACA CTT AGA TTC T – 3´		
pMIP12	Direto 5´ – TAG <u>GGATCC</u> AAG CTT AGT GAA GGT CAA CGT – 3´ Reverso 5´ – TAG <u>CTGCAG</u> TTA GGA TTT GTT ACA CTT AGA TTC T – 3´		
5´AAGCTTAGTGAAGGTCAACGTGCTATTTACAACCTCCATAAAAAGGTGAGAAA AGACGTAAAGAATTGTAGAATACCAGGACAACCACCTGCAAAGAACCTTACCA AACTGAAATGGAACAACTTCTGGCAAATAAGGCAAAACAACAAGCTAAAAGA TGTAAGTATGACTCCAATGATCCAAACGATTTTCATTATCGGAGATTTTGAGTCAA TAGGACAAAATCTAGCCGACTACCCAACCATCGAAGGCGCTATGAAGGACTGGT TGGAGGAGTACAAAAATTACAACCTTTGAGAAAAACCAGTGTAACGGAGACTGT AAGAATTATAAGCAAATGGTGTGGAATACTACTGAAGAAATAGGCTGTGGTTAT GAGAAGTGCGGGAAAAATTACTTGATCGTTTGTAACCTACGCCCTGGTGATTCA GAAGATAGACCATACGAAGCCAAACCAGAATCTAAGTGTAACAAATCCGAA – 3´			

smval-5	588 pb	GC = 43,7%	22,6 kDa
pLA71 e pLA73	Direto 5' – TAG <u>GGTACC</u> G GCG ATG GAC AAT GCC ACC AGA – 3' Reverso 5' – TAG <u>GCGGCCGC</u> TCT TTC GTT TGT ATG ATT ACA CCT – 3'		
pMIP12	Direto 5' – TAG <u>GGATCC</u> GCG ATG GAC AAT GCC ACC AGA – 3' Reverso 5' – TAG <u>CTGCAG</u> TCT TTC GTT TGT ATG ATT ACA CCT – 3'		
5'GCGATGGACAATGCCACCAGAGAGAAGCTGTAAAGCTGCATAACAATGCAA GGATATCAGTGATGCATGGACAGTTGGAAGGACAACCTATTGCCAAATCAATAA AACCATTGAAATGGAACATGGAGTTGGAGAAGAAAGCGCAAATGCTGGCCGAC ACATGTTACTTTGGACCGGATAGTGCAATAGAACGCAAAGTACCAGGCTTTACT AACGTCGGACAAAATTGGGCTGGTGCCAGTACAGTTGATATTGGGTTCCAACGA TGGCTGAATGAATACAAGAATTACGATTTCTTCAACCGACTGTGTCTTGTGGTC GGTGTATTCACTACACACAGATCGTGTGGGAGAACTACAGATATCGGATGTG GTGTTGCTACATGTCCTCATTCCCCATTCAAACCTAAGCATTGTGTGCAATTATGG TCCAGGAGGTGGATGCCCACGCCAATTTCCGTATAGTGTAAGGGTCTATACAG ACAATGGACTATAAAGTATGGCAGAAAATGGTATAGCTGGAGATACGGAAGAA GATGTCGTCCCGTATACGTGAAACAAAGGTGTAATCATACAAACGAAAGA – 3'			

Identificação do gene amplificado	Tamanho do amplicon (pb)	% Conteúdo GC	Massa molecular predita (kDa)
Vetor micobacteriano	Oligonucleotídeos diretos e reversos		
Sequência nucleotídica amplificada			
smval-5opt	588 pb	GC = 52%	22,6 kDa
pLA71	Direto 5' – TAG <u>GGTACC</u> G GAC AAT GCG ACG CGT GAA AAG – 3' Reverso 5' – TAG <u>GCGGCCGC</u> TTA ACG TTC ATT GGT GTG TGG TTA CA – 3'		
pMIP12	Direto 5' – TAG <u>GGATCC</u> GAC AAT GCG ACG CGT GAA AAG – 3' Reverso 5' – TAG <u>CTGCAG</u> TTA ACG TTC ATT GGT GTG TGG TTA CA – 3'		
5'GCGATGGACAATGCCACCAGAGAGAAGCTGTAAAGCTGCATAACAATGCAA GGATATCAGTGATGCATGGACAGTTGGAAGGACAACCTATTGCCAAATCAATAA AACCATTGAAATGGAACATGGAGTTGGAGAAGAAAGCGCAAATGCTGGCCGAC ACATGTTACTTTGGACCGGATAGTGCAATAGAACGCAAAGTACCAGGCTTTACT AACGTCGGACAAAATTGGGCTGGTGCCAGTACAGTTGATATTGGGTTCCAACGA TGGCTGAATGAATACAAGAATTACGATTTCTTCAACCGACTGTGTCTTGGTGGTC GGTGTATTCACTACACACAGATCGTGTGGGAGAACACTACAGATATCGGATGTG GTGTTGCTACATGTCCTCATTCCCCATTCAAACCTAAGCATTGTGTGCAATTATGG TCCAGGAGGTGGATGCCCACGCCAATTTCCGTATAGTGTAAGGGTCTATACAG ACAATGGACTATAAAGTATGGCAGAAAATGGTATAGCTGGAGATACGGAAGAA GATGTCGTCCCGTATACGTGAAACAAAGGTGTAATCATACAAACGAAAGA – 3'			

<i>smtsp-2</i>	234 pb	GC = 37,2%	8,8 kDa
pLA71 e pLA73	Direto 5' – TTC <u>GGTACC</u> G GAA AAG CCC AAG GTC AAA AAA CAC – 3' Reverso 5' – TTC <u>GCGGCCGC</u> TCA GTG CGC TTT GCT TAG ATC GCT – 3'		
pMIP12	Direto 5' – TTC <u>GGATCC</u> GAA AAG CCC AAG GTC AAA AAA CAC – 3' Reverso 5' – TTC <u>CTGCAG</u> TCA GTG CGC TTT GCT TAG ATC GCT – 3'		
5'GAAAAGCCCAAGGTCAAAAAACACATCACTAGTGCATTAAAAAAATTAGTAG ATAAGTACCGTAATGACGAACATGTTTCGAAAAGTTTTTGATGAAATCCAACAAA AATTACATTGCTGTGGTGCTGACTCTCCTAAAGATTATGGCGAAAATCCACCGAC ATCATGTTCAAAAGATGGCGTACAATTTACAGAGGGATGTATTA AAAAGGTCAG CGATCTAAGCAAAGCGCAC – 3'			

Identificação do gene amplificado	Tamanho do amplicon (pb)	% Conteúdo GC	Massa molecular predita (kDa)
Vetor micobacteriano	Oligonucleotídeos diretos e reversos		
Sequência nucleotídica amplificada			
<i>smtsp-2opt</i>	234 pb	GC = 49,4%	8,8 kDa
pLA71	Direto 5´ – TAG <u>GGTACC</u> G GAG AAA CCG AAA GTG AAA AAG CAC – 3´ Reverso 5´ – TTC <u>GCGGCCGC</u> TTA ATG TGC CTT GCT CAG GTC GCT – 3´		
pMIP12	Direto 5´ – TAG <u>GGATCC</u> GAG AAA CCG AAA GTG AAA AAG CAC – 3´ Reverso 5´ – TTC <u>CTGCAG</u> TTA ATG TGC CTT GCT CAG GTC GCT – 3´		
5´GAGAAACCGAAAGTGAAAAAGCACATCACCTCGGCGCTGAAGAAGTTGGTTGACAAGTACCGTAACGATGAGCATGTGCGCAAAGTTTTTGATGAAATTCAGCAAAAACTGCACTGTTGCGGTGCCGACTCTCCGAAGGACTATGGTGAGAATCCGCCGACCAGCTGTTCCAAAGATGGCGTCCAGTTCACGGAAGGCTGCATCAAGAAAGTCA GCGACCTGAGCAAGGCACATTAA – 3´			

*Predição da massa molecular (Compute pI/Mw Tool – ExPASy) (WILKINS et al., 1999).

*Sítio para enzimas de restrição sublinhado.

- GGTACC: Kpn I
- GCGGCCGC: Not I
- GGATCC: BamH I
- CTGCAG: Pst I

APÊNDICE B – Análise da requisição de códons dos fragmentos de *S. mansoni* e a disponibilidade dos respectivos tRNAs em *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2

Análise de códons realizada através do Graphical Codon Usage Analyser com base na tabela de códons de *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 (em preto) da Codon Usage Database (NAKAMURA; GOJOBORI; IKEMURA, 2000).

Comparação entre requisição de códons por *smtsp-2* nativo de *S. mansoni* (vermelho) e a disponibilidade do códon correspondente em BCG (preto)

Comparação entre requisição de códons por *smtsp-2opt* (vermelho) e a disponibilidade do códon correspondente em BCG (preto)

Comparação entre requisição de códons por *sm29* nativo de *S. mansoni* (vermelho) e a disponibilidade do códon correspondente em BCG (preto)

Comparação entre requisição de códons por *sm29opt* (vermelho) e a disponibilidade do códon correspondente em BCG (preto)

Comparação entre requisição de códons por *smval-5* nativo de *S. mansoni* (vermelho) e a disponibilidade do códon correspondente em BCG (preto)

Comparação entre requisição de códons por *smval-5opt* (vermelho) e a disponibilidade do códon correspondente em BCG (preto)

Comparação entre requisição de códons por *smval-4ppco* (vermelho) e a disponibilidade do códon correspondente em BCG (preto)

Comparação entre requisição de códons por *smstolp-2* nativo de *S. mansoni* (vermelho) e a disponibilidade do códon correspondente em BCG (preto)