

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



Dissertação de Mestrado

***Avaliação da imunogenicidade de linhagens de  
Lactococcus lactis produtoras da forma  
citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65  
de Mycobacterium leprae***

ORIENTADA: **Marcela Santiago Pacheco de Azevedo**

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Anderson Miyoshi**

CO-ORIENTADOR: **Prof. Dr. Vasco Azevedo**

BELO HORIZONTE – MG

Março – 2009


# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**MARCELA SANTIAGO PACHECO DE AZEVEDO**

***Avaliação da imunogenicidade de linhagens de  
Lactococcus lactis produtoras da forma  
citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65  
de Mycobacterium leprae***



Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Anderson Miyoshi**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Azevedo**

**BELO HORIZONTE – MG**

**Março – 2009**

043

Azevedo, Marcela Santiago Pacheco de

Avaliação da imunogenicidade de linhagens de *Lactococcus lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65 de *Mycobacterium leprae*. [manuscrito] / Marcela Santiago Pacheco de Azevedo. – 2009.

137 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Anderson Miyoshi. Co-orientador: Vasco Azevedo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

1. *Lactococcus lactis* – Teses. 2. Tuberculose – Vacina – Teses. 3. *Mycobacterium leprae* – Teses. 4. Proteínas de choque térmico – Teses. 5. Proteínas recombinantes – Teses. I. Miyoshi, Anderson. II. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral. IV. Título.

CDU: 616-002.5-097

*"No meio de qualquer dificuldade encontra-se a oportunidade"*  
*(Albert Einstein)*

## AGRADECIMENTOS

**Prof. Dr. Anderson Miyoshi** pela grande oportunidade, orientação e confiança depositada em mim. Muito obrigada!

**Prof. Dr. Vasco Azevedo** pela orientação, incansável motivação e pela confiança.

Aos **componentes da banca examinadora** por aceitarem o convite.

Ao **Prof. Dr. Célio Lopes Silva** pela colaboração e apoio financeiro.

À empresa **Farmacore Biotecnologia LTDA** que forneceu infraestrutura e suporte técnico para a realização deste trabalho.

Ao **Laboratório de Vacinas Gênicas** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP pelo auxílio durante os experimentos.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro e ao **CNPq** pela bolsa de estudo concedida.

À **coordenação, professores e colegas do curso** de Pós-Graduação em Genética do ICB-UFMG.

Aos **amigos do LGCM** que tornaram os dias mais leves e divertidos: Pablo, Tessália, Vívian, Dayane, Marcília, Síntia, Leonardo, Aracele, Marina, Wanderson, Camila, Anne, Anderson Rodrigues, Jonh, Vanessa; especialmente, Fernanda Dorella, Thiago, Siomar, Sarah, Fernanda Lima, Kátia, Luís, Núbia e Clarissa,

**Rosianne Peripato** pelos dias agradáveis na empresa.

Ao **Rogério P. Martins** pela amizade e à **Madrinha Júnia** pela inspiração.

À **Daniela Pontes** pelos valiosos ensinamentos.

Aos **primos** pelas risadas e momentos de descontração e à **família** pelo amor e por todo o interesse.

À minha irmã gêmea **Paula** por simplesmente existir.

À minha **Mãe** pela luta diária, força e incentivo.

Ao **Jaiminho** pelo apoio.

Ao meu **Pai** pela torcida e apoio I.N.C.O.D.I.C.I.O.N.A.L.

À **Magui** pelo carinho e presença.

Ao **Dani**, amor da minha vida, por me fazer uma pessoa mais feliz.

Levarei você em meu coração para onde eu for.

Às queridas **amidas de graduação** em Biologia na PUC: Ji, Barb's, Fef's, Camila, Laurinha, Dani e Flavinha.

# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS .....  | I         |
| LISTA DE TABELAS .....  | III       |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....  | IV        |
| RESUMO .....  | VI        |
| ABSTRACT .....  | VII       |
| <br>  |           |
| <b>I. APRESENTAÇÃO.....</b>   | <b>01</b> |
| <b>I.1 Colaborações.....</b>  | <b>02</b> |
| <b>I.2 Introdução Geral.....</b>  | <b>02</b> |
| <b>I.3 Estrutura da dissertação.....</b>  | <b>04</b> |
| <br>  |           |
| <b>II. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>06</b> |
| <b>II.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....</b>  | <b>07</b> |
| <b>II.2 Tuberculose .....</b>   | <b>07</b> |
| II.2.1 Patologia e imunologia da doença.....  | 08        |
| II.2.2 Tratamento e profilaxia .....  | 13        |
| II.2.2.1 Vacinas contra a tuberculose em desenvolvimento.....                             | 15        |
| II.2.2.1.1 Vacinas baseadas em linhagens de micobactérias<br>atenuadas ou inativadas..... | 16        |
| II.2.2.1.2 Vacinas de subunidade.....   | 17        |
| II.2.2.1.3 Vacinas baseadas em microrganismos vivos recombinantes.....                    | 18        |
| II.2.2.1.4 Vacinas gênicas.....   | 19        |
| <b>II.3 Proteínas do choque térmico (HSPs) .....</b>                                      | <b>20</b> |
| II.3.1 Hsp's: Conceitos gerais .....  | 20        |
| II.3.2 Hsp's como antígenos vacinais .....  | 21        |
| II.3.3 Hsp65 de <i>Mycobacterium Leprae</i> e a tuberculose .....                         | 22        |
| <b>II.4 A imunidade de mucosas e a tuberculose.....</b>                                   | <b>23</b> |
| <b>II.5 Utilização de bactérias vivas como vacinas de mucosa .....</b>                    | <b>24</b> |
| II.5.1 <i>Lactococcus lactis</i> , a bactéria láctica modelo.....                         | 25        |
| II.5.1.1. Expressão de proteínas heterólogas em <i>L. lactis</i> .....                    | 26        |
| II.5.1.2. <i>L. lactis</i> como vacinas vivas de mucosa .....                             | 27        |
| <b>III. JUSTIFICATIVA.....</b>  | <b>30</b> |



|   |           |
|---|-----------|
| <b>IV. OBJETIVOS</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>IV.1 Objetivo geral</b> .....  | <b>34</b> |
| <b>IV.2 Objetivos específicos</b> .....   | <b>34</b> |
| <b>IV.3 Objetivos finais associados ao projeto</b> .....  | <b>34</b> |
| <br>  |           |
| <b>V. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | <b>36</b> |
| <b>V.1 Linhagens bacterianas e acondicionamento microbiológico</b> .....  | <b>37</b> |
| <b>V.2 Indução da expressão gênica em <i>L. lactis</i></b> .....  | <b>39</b> |
| <b>V.3 Extração das frações protéicas, citoplasmática e secretada, das linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i></b> .....                            | <b>40</b> |
| <b>V.4 Teste do lisado do amebócito <i>Limulus</i> (LAL)</b> .....  | <b>41</b> |
| <b>V.5 Confirmação da expressão de rHsp65 produzida por <i>L. lactis</i></b> .....  | <b>41</b> |
| V.5.1 Quantificação protéica.....   | 41        |
| V.5.2 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida .....  | 41        |
| V.5.3 “Western Blotting”.....   | 42        |
| <b>V.6 Animais</b> .....  | <b>43</b> |
| <b>V.7 Produção de anticorpos anti-<i>hsp65</i></b> .....   | <b>43</b> |
| <b>V.8 Imunizações com as linhagens de <i>L. lactis</i> produtoras da forma secretada e citoplasmática do antígeno rHsp65 de <i>M. leprae</i></b> ..... | <b>43</b> |
| V.8.1 Preparo das amostras para imunização dos camundongos .....  | 43        |
| V.8.2 Imunizações e grupos experimentais.....   | 44        |
| <b>V.9 Caracterização do perfil de resposta imunológica</b> .....   | <b>45</b> |
| V.9.1 Processamento do soro e do Lba para dosagem de anticorpos .....   | 45        |
| V.9.2 Processamento do baço e do linfonodo para cultura de células.....   | 45        |
| V.9.3 CULTURA DE CÉLULAS PARA DOSAGEM DE CITOCINAS .....  | 45        |
| V.9.4 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL .....  | 46        |
| V.9.4.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos .....   | 46        |
| V.9.5 Caracterização do perfil da resposta imune celular .....  | 46        |
| V.9.5.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas .....  | 46        |
| V.9.6 Análises estatísticas.....  | 47        |
| <b>V.10 Aspectos bioéticos e de biossegurança</b> .....   | <b>47</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>VI. RESULTADOS</b> .....   | <b>49</b> |
| <b>VI.1 Confirmação da expressão de rHsp65 produzida em <i>L. lactis</i></b> .....  | <b>50</b> |
| VI.1.1 “Ensaio de Bradford” .....   | <b>50</b> |
| VI.1.2 “Western Blotting” .....   | <b>50</b> |
| VI.1.3 Teste do Lisado do Amebocito <i>Limulus</i> (LAL).....   | <b>52</b> |
| <b>VI. 2 Caracterização do Perfil de Resposta Imunológica</b> .....   | <b>53</b> |
| VI.2.1 Ensaios de imunogenicidade .....   | <b>53</b> |
| VI.2.2 Caracterização do perfil de resposta imune humoral .....   | <b>53</b> |
| VI.2.2.1 Imunoglobulinas IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 detectadas no<br>soro dos animais imunizados .....   | <b>54</b> |
| VI.2.2.2 Imunoglobulina IgA anti-Hsp65 detectada no Lavado Bronco<br>Alveolar (Lba) dos animais imunizados .....  | <b>55</b> |
| VI.2.3 Caracterização do perfil de resposta imune celular .....   | <b>56</b> |
| VI.2.3.1 Avaliação da produção das citocinas INF- $\gamma$ , IL-12, IL-5 e<br>IL-10 nos linfonodos derivados dos animais vacinados com as<br>linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> .....      | <b>56</b> |
| VI. 2. 3. 2 Avaliação da produção das citocinas INF- $\gamma$ , IL-12, IL-5 e IL-10<br>nos esplenócitos derivados dos animais vacinados com as<br>linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> ..... | <b>58</b> |
| VI. 2. 3. 3 Avaliação da produção da citocina IL-10 no <u>L</u> avado <u>B</u> ronco<br><u>A</u> lveolar (Lba) dos animais vacinados com as linhagens recombinantes<br>de <i>L. lactis</i> .....    | <b>60</b> |
| <b>VII. DISCUSSÃO</b> .....   | <b>61</b> |
| <b>VIII. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....  | <b>67</b> |
| <b>VIII.1 Conclusões</b> .....  | <b>68</b> |
| <b>VIII.2 Perspectivas</b> .....  | <b>68</b> |
| <b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>69</b> |
| <b>ANEXOS</b> .....   | <b>88</b> |
| <b>Seção I - Capítulo “Lactic Acid Bacteria as live vectors: Heterologous protein production<br/>and delivery systems”</b> .....  | <b>89</b> |



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Cross-priming .....   | 11 |
| <b>Figura 2:</b> Processos envolvidos na infecção, no curso da doença e nos mecanismos imunes ativados durante a infecção por <i>M. tuberculosis</i> .....   | 12 |
| <b>Figura 3:</b> Aplicações recentes das BL recombinantes.....   | 25 |
| <b>Figura 4:</b> Representação esquemática dos vetores de expressão pXyIT:SEC:hsp65 e pXyIT:CYT:hsp65.....   | 39 |
| <b>Figura 5:</b> Imunodeteção do antígeno rHsp65 na fração protéica celular e secretada oriunda das linhagens de <i>L. lactis</i> recombinantes .....  | 51 |
| <b>Figura 6:</b> Anticorpos dos subtipos IgG1 e IgG2a específicos para rHsp65 detectados em amostras de soro dos animais imunizados intranasalmente com as linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> ..... | 54 |
| <b>Figura 7:</b> Anticorpos IgA específicos para rHsp65 detectados em amostras do Lba dos animais imunizados intranasalmente com as linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> .....                        | 55 |
| <b>Figura 8:</b> Indução da produção de IL-12 pelas células do linfonodo dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> .....   | 56 |
| <b>Figura 9:</b> Indução da produção de IL-10 e IL-5 pelas células do linfonodo dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> .....  | 57 |
| <b>Figura 10:</b> Indução da produção de INF- $\gamma$ e IL-12 pelos esplenócitos dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> .....  | 58 |
| <b>Figura 11:</b> Indução da produção de IL-10 e IL-5 pelos esplenócitos dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> .....   | 59 |

**Figura 12:** Indução da produção de IL-10 no Lba dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *L. lactis* ..... **60**

## LISTA DE TABELAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>TABELA 1:</b> Respostas imunes detectadas após vacinação com linhagens Recombinantes de <i>L. lactis</i> .....   | <b>29</b> |
| <b>TABELA 2:</b> Linhagens bacterianas.....   | <b>38</b> |
| <b>TABELA 3:</b> Modo de preparo dos géis de “separação” e “concentração” .....   | <b>42</b> |
| <b>TABELA 4:</b> Resultados do ensaio do Lisado do Amebócito do <i>Limulus</i> realizado a partir das frações protéicas extraídas das linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> ..... | <b>52</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|              |  |
|--------------|--|
| µg           | - Micrograma ( $10^{-3}$ g)  |
| µl           | - Microlitro ( $10^{-3}$ L)  |
| AIDS         | - <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)                     |
| BCG          | - Bacilo Calmette Guérin   |
| BCIP         | - 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt   |
| BL           | - Bactérias Lácticas   |
| D.O.         | - Densidade ótica  |
| ELISA        | - <i>Enzyme-linked immunoasorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)                                     |
| EP           | - <i>European Pharmacopeia</i>   |
| FDA          | - <i>Food and Drug Administration</i>  |
| GRAS         | - “Generally Regarded As Safe”   |
| HCl          | - Ácido Clorídrico   |
| HIV          | - “Human deficiency vírus”   |
| HSP          | - “ <i>heat shock protein</i> ” – proteínas do choque térmico  |
| IFN $\gamma$ | - Interferon gama  |
| Ig           | - Imunoglobulina   |
| IgA          | - Imunoglobulina A   |
| IgG          | - Imunoglobulina G   |
| IL           | - Interleucina   |
| kDa          | - kilo Dalton  |
| Lba          | - <i>Bronchoalveolar lavage</i> (Lavado Bronco Alveolar)   |
| LPS          | - Lipopolissacarídeo   |
| M            | - Molar  |
| MHC I        | - <i>Major Histocompatibility Complex class I</i> (Complexo maior de histocompatibilidade de classe I)   |
| MHC II       | - <i>Major Histocompatibility Complex class II</i> (Complexo maior de histocompatibilidade de classe II) |
| Min          | - Minuto   |
| ml           | - Mililitro ( $10^{-3}$ L)   |
| Mtb          | - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>  |
| NaOH         | - Hidróxido de sódio   |
| NICE         | - “ <i>Nisin Controlled gene Expression</i> ” (Sistema de Expressão Gênica controlado por nisina)        |

|              |   |
|--------------|---|
| NK           | - "Natural Killer cells"  |
| O.N.         | - Overnight   |
| PBS          | - " <u>Phosphate Buffer Solution</u> "  |
| PLD          | - fosfolipase D   |
| PMSF         | - Fenil-metil sulfonil fluoreto   |
| q.s.p        | - Quantidade Suficiente Para  |
| rHsp65       | - Proteína do choque térmico de 65 kDa recombinante   |
| rpm          | - <u>Rotações por minuto</u>  |
| SDS-PAGE     | - <u>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</u><br>(Eletroforese em gel de poliacrilamida-duodecil sulfato de sódio) |
| T20          | - Tween 20  |
| TB           | - Tuberculose   |
| TCPDO        | - Tratamento de Curto Prazo Diretamente Observado   |
| TEMED        | - N,N,N', N'-tetrametiletilenodiamina   |
| TH1          | - Linfócitos TCD4+ auxiliares característicos da resposta imunológica do tipo 1   |
| TH2          | - Linfócitos T CD4+ auxiliares característicos da resposta imunológica do tipo 2  |
| TNF $\alpha$ | - <u>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></u> (Fator de necrose tumoral)   |
| UFC          | - <u>Unidade Formadora de Colônias</u>  |
| USP          | - <i>United States Pharmacopeia</i>   |
| XIES         | - "Xylose Inducible Expressing System"  |



## RESUMO

Descoberto em 1882 por Robert Koch, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ainda permanece como um grande problema de saúde pública uma vez que é o principal agente causador da Tuberculose (TB), uma doença infecto-contagiosa que atinge quase 1/3 da população mundial. Apesar da BCG, única vacina disponível para uso clínico, ser capaz de proteger crianças eficientemente, ela não é capaz de proteger indivíduos adultos acometidos com a tuberculose pulmonar. Sendo assim, estratégias para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e economicamente viáveis são alvo de intensa investigação. Nesse contexto, vacinas vivas de mucosa utilizando a bactéria láctica *Lactococcus lactis* como um veículo para a entrega de antígenos surge como uma alternativa segura e interessante no que concerne ao desenvolvimento de uma nova vacina contra a TB. Neste contexto, em um trabalho prévio, nosso grupo de pesquisa construiu linhagens de *L. lactis* produtoras da forma citoplasmática ou secretada da proteína do choque térmico de 65 kDa de *Mycobacterium leprae* (Rocha, 2007), um antígeno imunodominante capaz de induzir efeitos profiláticos e terapêuticos em animais, utilizando o sistema de expressão induzido por xilose (XIES - Xyllose Inducible Expression System; Miyoshi et al., 2004). No presente trabalho, a capacidade produtiva destas linhagens em relação à quantidade, qualidade e teor de LPS do antígeno recombinante foi confirmada através do ensaio de “Bradford”, “Western Blotting” e LAL. O potencial vacinal das linhagens foi avaliado através de ensaios de imunização intranasal em camundongos BALB/c a fim de se caracterizar a imunogenicidade conferida pelas mesmas. Os resultados obtidos revelaram que o antígeno, livre de LPS, é endereçado de maneira correta para o citoplasma ou meio extracelular. Além disso, foi visto que os animais vacinados não desenvolveram resposta imune humoral e celular nos linfonodos e no baço seis dias após a última imunização. Entretanto, observou-se que a linhagem *L. lactis* produtora da forma citoplasmática do antígeno rHsp65 reduziu significativamente ( $p < 0.05$ ) os níveis de IL-10 no Lavado Bronco Alveolar (Lba) dos animais. As linhagens recombinantes permitirão, em um futuro próximo, a purificação da proteína recombinante livre de LPS. Contudo, para a formulação de uma nova estratégia vacinal contra a TB baseada em *L. lactis*, alguns pontos deverão ser padronizados como, por exemplo, a linhagem ideal a ser utilizada nos ensaios de imunização, o protocolo e a localização celular do antígeno.

## ABSTRACT

Discovered in 1882 by Robert Koch, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) remains a major public health problem since it is the main causative agent of tuberculosis (TB), an infectious-contagious disease that affects almost 1/3 of world population. Although BCG, the only available vaccine, has proven to be efficient in prevent TB in children, a new vaccine is urgently required because it can not prevent pulmonary tuberculosis in adults. In this context, the use of the food-grade lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* to delivery antigens appears to be a good and safe alternative. Therefore, our research group has previously developed *L. lactis* strains producing either cytoplasmatic or secreted forms of Hsp65 from *Mycobacterium leprae* (Rocha, 2007), an immunodominant antigen able to induce prophylactic and therapeutic effects in animals, based on the Xylose-Inducible Expression System (XIES; Miyoshi et al., 2004). In this work, the capacity of these strains in produce the antigen and parameters such as quantity, quality and content of the LPS was confirmed by "Bradford", "Western Blotting" and LAL. The potential use of recombinant *L. lactis* as vaccines against TB was assayed after intranasal immunization of BALB/c mice with them. Results showed that the LPS free antigen is correctly addressed to the cytoplasm or extracellular medium. Furthermore, analysis by ELISA showed that the vaccinated mice did not develop humoral and cellular immune response in lymph nodes and spleen six days after the booster immunization. However, it was observed that *L. lactis* strain producing cytoplasmatic form of rHsp65 significantly reduced the amount of IL-10 ( $p < 0.05$ ) in *bronchoalveolar lavage* (Lba) of vaccinated animals. Recombinant strains will allow, in near future, antigen purification and its use in clinical trials. However, to formulate a new vaccine strategy against TB based on *L. lactis*, some points should be standardized, such as the ideal strain to be used in immunizations, the protocol and location of the cell antigen.

# I APRESENTAÇÃO

## I.1 Colaborações

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em parceria com:

1. O Centro de Pesquisas em Tuberculose localizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), liderado pelo Prof. Dr. Célio Lopes Silva;
2. Laboratório de Vacinas Gênicas (LVG) da FMRP-USP, coordenado pelo Prof. Dr. Célio Lopes Silva;
3. Empresa FARMACORE Biotecnologia LTDA; Ribeirão Preto – SP.

Além das instituições acima mencionadas, o trabalho também contou com o apoio financeiro de outras instituições, como:

1. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
2. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);

## I.2 Introdução Geral

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que aflige a humanidade desde a Antiguidade e que ainda permanece amplamente distribuída nos dias atuais (Campos & Piantra, 2001). Ela é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo Gram-positivo pertencente ao grupo dos actinomicetos que foi isolado pela primeira vez em 1882 por um bacteriologista chamado Robert Koch. Cento e vinte sete anos após esta descoberta, um terço da população mundial ainda se encontra infectada com o *M. tuberculosis* em estado latente, fato que torna essa doença um dos principais problemas sociais, econômicos e de saúde pública no mundo (Lugo & Bewley, 2008).

A TB é considerada uma doença socialmente determinada, pois está associada à pobreza, à aglomeração urbana e, mais recentemente, à emergência da epidemia do vírus da AIDS (HIV) (Snider & Montagne, 1994). No Brasil a doença agravou-se no final do século XIX e início do século XX. Dessa maneira, várias instituições foram formadas com o intuito de erradicar a TB do país. Entretanto, apesar das tentativas para controlar a doença, o Brasil ainda continua com altos índices de pessoas infectadas e mortalidade anual de quase 6.000 óbitos (Hijjar et al., 2007). Os números podem ser maiores, devido à ainda insuficiente notificação no Brasil.

A TB pode ser tratada com o uso de antimicrobianos, como, por exemplo, a isoniazida, a rifampicina e o etambutol. Todavia, o longo tempo de tratamento exigido (no

mínimo seis meses) com a associação de três ou mais drogas faz com que os pacientes desistam do mesmo ou o façam de maneira inadequada. Esses fatores contribuíram para o surgimento de linhagens de micobactérias multidrogas resistentes (MDR-TB) e, mais recentemente, extensivamente resistentes (XDR-TB), tornando o tratamento mencionado acima pouco eficaz. Além da quimioterapia convencional, a TB pode ser controlada utilizando-se a BCG (Bacillus Calmette-Guérin), única vacina disponível para uso clínico. Embora venha sendo amplamente utilizada no Brasil e em outros países, a eficácia da BCG permanece controversa. Verificou-se que a vacina é capaz de proteger crianças contra as formas mais severas de TB (Liu et al., 2009). Em contraste, a eficácia da vacina em pacientes adultos acometidos com a TB pulmonar varia de 0 a 80%, dependendo da população estudada (Britton, 2003; Liu et al., 2009). Dessa maneira, estratégias para o desenvolvimento de novas vacinas mais eficazes e economicamente viáveis tem sido alvo de intensa investigação.

Com a caracterização de muitas proteínas codificadas pelo genoma das micobactérias foi possível identificar inúmeros antígenos imunogênicos e/ou imunodominantes como promissores candidatos ao desenvolvimento de vacinas mais eficazes que a BCG (Reed & Lobet, 2005; Ginsberg, 2002). Em 1999, pesquisadores da Universidade de São Paulo desenvolveram uma vacina de DNA baseada no antígeno Hsp65 de *Mycobacterium leprae* que, quando administrada por via intramuscular, apresentava efeitos profiláticos e terapêuticos em camundongos (Silva et al., 1999). Apesar desse antígeno ter sido utilizado com sucesso em animais de pequeno porte, foi demonstrado que o mesmo quando apresentado ao sistema imune de animais de grande porte sob a forma de “DNA nu” era degradado por endonucleases apresentando-se fracamente imunogênico (Souza et al., 2008). Dessa maneira há uma grande necessidade pela busca de novas estratégias que possam evitar a degradação do Hsp65 *in vivo*. Além disso, o DNA plasmidiano pode ser capturado pelas células imunes, permanecendo viável dentro do organismo por muito tempo. Assim, a diminuição da dose, bem como a otimização da vacina utilizando carreadores tem sido alvo de inúmeras pesquisas (Coelho-Castelo et al., 2006).

A maioria das vacinas baseadas em Hsp65 desenvolvidas até então foram projetadas para serem administradas por via parenteral. No entanto, além de se tratar de uma rota invasiva, vacinas administradas parenteralmente são pouco eficientes em estimular o sistema imune associado às mucosas. Além disso, quando pensamos na utilização do antígeno, seja na sua forma nativa ou recombinante, um outro problema se faz presente: a inexistência de um produto livre de contaminação por endotoxina (lipopolissacarídeo: LPS), o que compromete sua utilização clínica. No caso da produção de antígenos com potencial vacinal, a disponibilidade de um produto final livre dessa toxina é extremamente necessária, uma vez que o LPS é capaz de induzir respostas imunológicas

inespecíficas (Stewart & Yung, 2004). Diante disso, sistemas de apresentação de antígenos diretamente à superfície de mucosas, incluindo a via de administração oral, podem representar uma alternativa promissora para o desenvolvimento de uma nova vacina contra a TB, uma vez que estes estimularão a resposta imune no sítio inicial de infecção.

As Bactérias Lácticas (BL) surgem como uma solução interessante para estes problemas, pois foi demonstrado que elas são capazes de produzir com eficiência antígenos heterólogos e gerar respostas imunológicas contra os antígenos expressos (Wells & Mercenier, 2008). Além disso, por serem empregadas na indústria alimentícia há séculos em processos de fermentação e preservação de alimentos elas são consideradas seguras contendo o status “GRAS” (Steidler & Rottiers, 2006). Dentre estas, *Lactococcus lactis* figura como um microrganismo modelo no estudo das BL não só pela sua importância econômica, mas por ser a mais bem caracterizada e possuir diversas ferramentas genéticas já desenvolvidas, facilitando a expressão heteróloga de moléculas de interesse (Bermúdez-Humarán et al., 2004). Várias proteínas de interesse biotecnológico já foram produzidas em *L. lactis* e a sua utilização como veículo vacinal foi bem sucedida (Wells & Mercenier, 2008). Sendo assim, a utilização de *L. lactis* produzindo o antígeno Hsp65 de *M. leprae* é bastante promissora no que concerne ao desenvolvimento de uma nova vacina contra a TB.

### I.3 Estrutura da dissertação

O manuscrito será apresentado inicialmente com uma introdução dividida em três assuntos principais. O primeiro abordará as características do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*; a Tuberculose (TB) como sendo uma doença reemergente no mundo e os aspectos imunológicos da infecção pelo bacilo. O segundo assunto tratará das proteínas do choque térmico (HSP's) como candidatas ao desenvolvimento de novas vacinas contra a TB, focando na proteína de 65 kDa de *M. leprae* como antígeno vacinal. O terceiro assunto abordará as Bactérias Lácticas (BL) como veículos para expressão de antígenos heterólogos, especialmente no que concerne ao uso de linhagens de *L. lactis* recombinantes como vacinas vivas de mucosa. Posteriormente, será apresentada a justificativa e os objetivos do trabalho bem como a metodologia utilizada para o desenvolvimento do mesmo. Os resultados serão divididos em duas partes. A primeira parte explicitará a confirmação da capacidade de expressão do antígeno rHsp65 por *L. lactis*; e a segunda demonstrará a caracterização do Perfil de Resposta Imunológica das linhagens de *L. lactis* recombinantes. A seguir, os resultados serão discutidos e, por fim, as conclusões e as perspectivas do presente trabalho serão demonstradas. Após as Referências Bibliográficas, a dissertação apresentará em anexo a seção I, contendo o capítulo de livro que se encontra no prelo intitulado “*Lactic Acid Bacteria as live vectors: Heterologous protein production and delivery*

*systems*” redigido por nosso grupo de pesquisa em colaboração com pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (INRA), França; e a seção II, que apresentará o Currículo Lattes com as minhas produções científicas obtidas até o momento.

**II**

# **INTRODUÇÃO**



## II.1 *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo Gram-positivo, imóvel, aeróbio estrito que não esporula. Esse microrganismo pertence à família Mycobacteriaceae e ao grupo dos actinomicetos, os quais incluem também os gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium*. As espécies desses gêneros, também denominados como grupo CMN, apresentam algumas características em comum tais como a organização específica da parede celular que é composta principalmente de peptidoglicanos, arabinogalactano e ácidos micólicos. Além disso, apresentam alto conteúdo G + C do genoma (47-74%) (Dorella et al., 2006).

É necessário recorrer à técnica de coloração especial (Ziehl-Neelsen) para a visualização das células de *M. tuberculosis*, pois a coloração pela técnica de Gram é ineficaz devido aos ácidos micólicos presentes na parede celular desse bacilo. Com a técnica de Ziehl-Neelsen, as células se coram de vermelho (fucsina concentrada) e resistem à descoloração pelo soluto de EBNER (álcool + HCL). É por essa razão que são designados “bacilos álcool ácido resistentes” (Holt et al., 1994). Além disso, *M. tuberculosis* apresenta desenvolvimento lento com tempo de geração de 12 a 18 horas, seu tamanho varia de 0,2-07 x 1-10 µm e bioquimicamente está classificado como catalase positivo, arilsulfatase positivo e resistente a lisozima (Holt et al., 1994).

As micobactérias estão amplamente distribuídas no solo e na água sendo que uma pequena parte é encontrada em animais e humanos como patógenos intracelulares. *M. tuberculosis* juntamente com *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium microti* podem causar uma doença conhecida como Tuberculose (TB), sendo *M. tuberculosis* o principal agente etiológico da Tuberculose humana (Pfyffer et al., 1998).

## II.2 Tuberculose

Desde a antiguidade, a Tuberculose (TB) é uma doença que aflige a humanidade. Existem registros arqueológicos da doença entre diversos povos da antiguidade, como, por exemplo, nas múmias egípcias, onde foram encontradas lesões que sugeriam a doença na coluna espinhal, conhecida como *Mal de Pott* (Campos & Piantra, 2001). Hipócrates em 400 a.C. descreveu em pacientes características clínicas pelas quais, atualmente, se pode diagnosticar a doença (Grange, 1990). O agente causador da enfermidade, hoje em dia conhecido como *M. tuberculosis*, foi isolado pela primeira vez em 1882 por um bacteriologista alemão chamado Robert Koch. Cento e vinte sete anos após esta descoberta, um terço da população mundial ainda se encontra infectada com *M. tuberculosis*

em estado latente, fato que torna a tuberculose um dos principais problemas sociais, econômicos e de saúde pública no mundo (Lugo & Bewley, 2008). Segundo Pieters (2008) 10% das pessoas infectadas desenvolvem a TB ativa e cerca de dois milhões morrem anualmente em função da epidemia.

A TB é uma doença infecto-contagiosa que está intimamente associada à pobreza, desigualdade social, más condições de vida e habitação, deficiente acesso a serviços de saúde, à aglomeração urbana, à desestruturação dos serviços de controle da TB e, mais recentemente, à emergência da epidemia do vírus da AIDS (HIV). Estes estão entre os principais fatores que contribuem para a expansão da doença no mundo (Snider & Montagne, 1994).

A Tuberculose no Brasil agravou-se no final do século XIX e início do século XX quando metade das pessoas atingidas pela doença morria. Várias instituições estiveram envolvidas na luta contra a TB no país tais como a *Fundação Ataulpho de Paiva*, *Inspetoria de Profilaxia da TB*, *Liga Brasileira Contra a Tuberculose*, *Fundação Oswaldo Cruz* dentre outras. Apesar das tentativas para controlar a doença, o Brasil ainda continua com altos índices de pessoas infectadas (cerca de 80.000 novos casos notificados por ano) e mortalidade anual de quase 6.000 óbitos (Hijjar et al., 2007). Os números podem ser maiores, devido à ainda insuficiente notificação no Brasil. Atualmente, quase 70% dos pacientes são curados e cerca de 12% abandonam o tratamento (Who, 2004). Entre os anos de 1981 e 2001 foram registrados no Brasil 1.818.501 casos confirmados de TB, sendo o maior número de casos na região sudeste (810.875 casos) (Who, 2004).

### II.2.1 PATOLOGIA E IMUNOLOGIA DA DOENÇA

A infecção por *M. tuberculosis* é iniciada pela inalação de gotículas de secreção (aerossóis) contendo bacilos viáveis que são eliminados através da fala, tosse ou espirro de uma pessoa que contém a tuberculose ativa. Assim, a TB é uma infecção que acomete mais comumente o trato respiratório inferior, sendo os pulmões os sítios primários da infecção (Loundon & Roberts, 1967). Mais raramente, *M. tuberculosis* também infecta outras regiões do corpo como o sistema nervoso central (Rock et al., 2008), ossos (Yoshida et al., 2009), rins (Gurski & Baker, 2008) e trato geniturinário (Vilasaró et al., 2008). O desenvolvimento da infecção depende de vários fatores, como por exemplo, a virulência da linhagem e as condições imunológicas e características genéticas do indivíduo exposto (Dannenberg, 1989).

Uma vez no pulmão, os bacilos são capturados por macrófagos alveolares por meio de diferentes receptores de reconhecimento padrão (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*). Nos macrófagos os receptores mais comuns são os receptores Fc, os receptores de

manose, os receptores do sistema complemento (CR), dentre outros (Pieters, 2008). A habilidade que o bacilo possui de interagir com múltiplas moléculas de superfície dos macrófagos está provavelmente relacionada à sua complexa parede celular (Pieters, 2008). Foi observado que o receptor envolvido na internalização da micobactéria influencia drasticamente suas chances de sobrevivência dentro dos macrófagos. Por exemplo, a ingestão de bacilos através de receptores para a porção Fc do anticorpo ligado ao antígeno micobacteriano resulta em uma resposta inflamatória nos macrófagos e, logo, os bacilos são eliminados de dentro da célula. Em contraste, a internalização via receptores do complemento tipo 3 (CR3) previne a ativação dos macrófagos, o que favorece a sobrevivência dos bacilos dentro da célula (Caron & Hall, 1998).

As interações iniciais do bacilo com o macrófago levam à ativação celular e à rápida produção de citocinas pro e anti-inflamatórias. Os macrófagos ativados em contato com os produtos sintetizados pela micobactéria passam a produzir fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-12 (IL-12) (Berrington & Hawn, 2007). Consecutivamente, essas citocinas ativam e recrutam células inflamatórias da imunidade inata como neutrófilos, precursores de células dendríticas e células NK (*Natural Killer*) para o sítio da infecção (Berrington & Hawn, 2007). O IL-12 possui importante papel no combate da infecção uma vez que induz a produção de interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) por células NK. Em sinergia com o TNF- $\alpha$ , o INF- $\gamma$  induz atividades microbidas nos macrófagos infectados tais como a fusão do lisossomo ao fagossomo, liberação de enzimas com potencial lítico e estimulação da apoptose da célula infectada. Essas atividades irão auxiliar na eliminação do bacilo (Fairbairn, 2004; Berrington & Hawn, 2007).

A maioria dos bacilos pode ser imediatamente eliminada no interior dos fagolisossomos pelas enzimas lisossomais e intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio (Flynn & Chan 2005). Entretanto, uma pequena parcela é capaz de escapar da fusão do fagossomo com o lisossomo e sobreviver dentro dos macrófagos. A proteína Kinase G (PknG) produzida pelos bacilos é um importante fator de virulência que inibe a maturação dos fagossomos impedindo, assim, a sua fusão com os lisossomos (Walburger et al., 2004). Os componentes lipídicos da parede celular de *M. tuberculosis* também possuem papel essencial em inibir a formação de fagolisossomos. Além disso, a micobactéria ainda apresenta outras requintadas estratégias para continuar viável dentro dos macrófagos. *M. tuberculosis* é capaz de produzir enzimas como catalase-peroxidase (KatG) cuja função é inativar intermediários reativos do oxigênio, o que favorece sua permanência dentro da célula (Li et al., 1998).

A ativação inicial decorrente da captura dos bacilos muitas vezes não é suficiente para eliminá-los uma vez que esses organismos possuem diversas estratégias para burlar o sistema imune, como mencionado acima. Dessa forma, o controle da infecção também

requer a participação da resposta imune celular específica mediada principalmente por células T (Flynn & Chan, 2005).

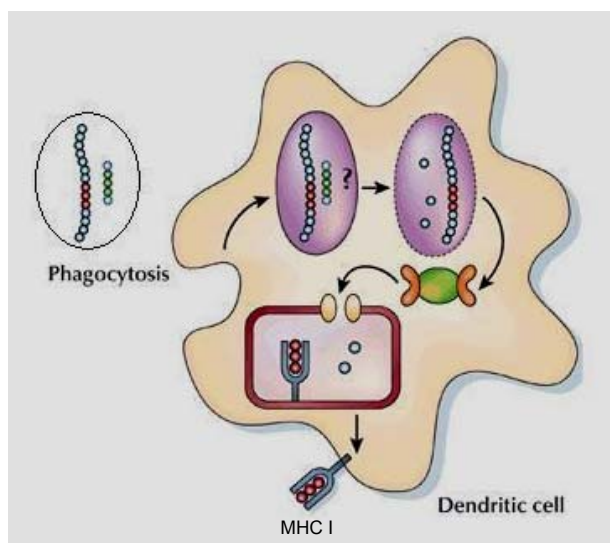
Os macrófagos são os principais responsáveis por ativar a resposta imune adaptativa atuando como células apresentadoras de antígenos (APC's). Essas células migram para os linfonodos e lá apresentam os antígenos de *M. tuberculosis* para células T "naive" via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Gurunathan et al., 2000). Pelo fato das micobactérias residirem no interior de fagossomos, as suas proteínas antigênicas rapidamente têm acesso às moléculas de processamento e apresentação de antígenos do tipo MHC classe II. As células T CD4<sup>+</sup> reconhecendo os antígenos apresentados por essa via tornam-se ativadas e capazes de secretar citocinas (Kaufmann, 2004).

As células T CD4<sup>+</sup> ativadas podem ser divididas em dois subgrupos com base em sua produção de citocinas. As células T CD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo 1 (Th1) são induzidas por IL-12 e produzem INF- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ . Já as células T CD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo 2 são induzidas por IL-4 e produzem grande quantidade dessa citocina e de outras como IL-10, IL-5 e IL-13 (Hoft, 2008). As células T CD4<sup>+</sup> ativadas migram para o local da infecção e, de acordo com as citocinas presentes no ambiente, são capazes de se diferenciar em efetores do tipo Th1 ou Th2. Como os macrófagos ativados que entraram em contato com a micobactéria produzem IL-12, o padrão de resposta imune observado na infecção por *M. tuberculosis* é do tipo Th1. Wangoo e colaboradores (2001) demonstraram que a indução do padrão Th1 em camundongos gera proteção contra o desafio com *M. tuberculosis* enquanto que a indução do padrão Th2 gera susceptibilidade a esse patógeno. Os mecanismos efetores das células Th1 consistem em produzir principalmente INF- $\gamma$ , citocina essencial no controle da micobactéria dentro do hospedeiro, cuja função é estimular a síntese de várias substâncias microbicidas pelos macrófagos favorecendo a eliminação do bacilo (Flynn, 2004).

Apesar dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> serem as principais células ativadas devido aos antígenos da micobactéria estarem localizados dentro de fagossomos, as células T CD8<sup>+</sup> são também importantes na resposta contra o bacilo. Essas células geralmente reconhecem antígenos apresentados pela maquinaria de apresentação MHC tipo I, que se liga a fragmentos antigênicos sintetizados no citoplasma da célula. Sendo *M. tuberculosis* um patógeno que está localizado nos fagossomos e não no citoplasma da célula, ainda não está claro como os antígenos da micobactéria atingem o MHC I da célula hospedeira. Uma das hipóteses sugeridas para resolver essa questão baseia-se no fato de que dentro dos macrófagos o *M. tuberculosis* irá induzir apoptose, o que levaria à produção de vesículas extracelulares carregando uma grande variedade de antígenos. Essas vesículas rapidamente são engolfadas por células dendríticas que então apresentam os antígenos via

MHC I. Esse processo é conhecido como “cross-priming” (Fig. 1). Os antígenos de *M. tuberculosis* podem ter acesso à maquinaria de apresentação de antígenos MHC I de outros modos. Embora esteja localizado dentro de fagossomos, foi demonstrado que o bacilo pode ter acesso ao citoplasma da célula hospedeira. Com isso, os antígenos secretados são capazes de alcançar a maquinaria MHC I e serem apresentados para linfócitos T CD8+ (Mazzacarro et al., 1996).

Após o reconhecimento do antígeno, as células T CD8+ ativadas são estimuladas e passam a produzir granulísina e perforinas, componentes que agem diretamente nas micobactérias intra e extracelulares (Hoft, 2008).

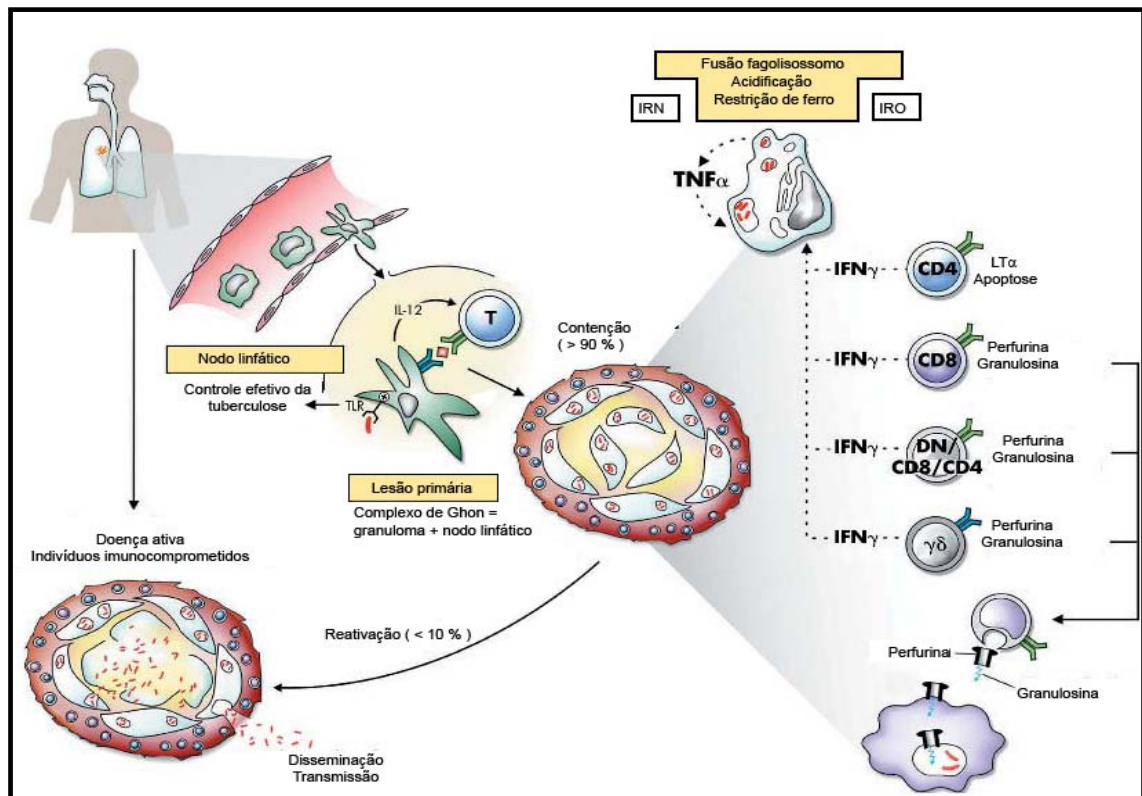


**Figura 1: Cross-priming.** Células dendríticas circulantes fagocitam os fragmentos do bacilo juntamente com os seus antígenos. A partir daí, os antígenos são processados por essas células e apresentados através do MHC I para linfócitos T CD8+ (Adaptado de Bahjat & Schoenberger, 2004).

Outros linfócitos T menos comuns também participam da resposta imune protetora. Após a estimulação por antígenos não protéicos da micobactéria, as células T  $\gamma\delta$  podem expandir rapidamente e produzir muitas citocinas, especialmente INF- $\gamma$ . Essas células podem desenvolver funções de memória efetora, incluindo o desenvolvimento de um perfil de resposta similar aos linfócitos Th1 CD4+. Outro grupo menos comum de linfócitos são as células T restritas a CD1. Elas reconhecem glicolipídios do *M. tuberculosis* apresentados por moléculas CD1 e secretam perforinas e granulísinas que têm a função de eliminar os bacilos de dentro dos macrófagos (Kaufmann, 2002; Hoft, 2008).

A comunicação entre as células T e os macrófagos é alcançada através das várias citocinas já citadas, principalmente TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-12. Essa comunicação permite com que os macrófagos possam controlar a replicação micobacteriana dentro de estruturas

denominadas granulomas (Kaufmann, 2004). Os granulomas são formados por uma área central de necrose caseosa (Cosma et al., 2003), circundada por macrófagos infectados, linfócitos T CD4+ em maior quantidade e T CD8+ em menor quantidade, e um pequeno influxo de linfócitos B distribuídos periféricamente. Estas estruturas, evidenciadas na reação inflamatória crônica, mantêm os bacilos em estado quiescente, conservando assim sua capacidade de replicação e disseminação (Silva et al., 2001; Russell, 2007). Quando o microrganismo está contido dentro do granuloma, a doença é assintomática. Cerca de 90% das pessoas infectadas apresentam o bacilo em sua forma latente no organismo dentro destas estruturas. Essa contenção geralmente falha quando a resposta imune do hospedeiro é inadequada; situação esta onde a população de células T CD4+ está diminuída. Desse modo, o granuloma é rompido espalhando os bacilos para os diversos tecidos. A doença é, então, reativada e o paciente torna-se contagioso (Wallis, 2007). A Figura 2 ilustra os mecanismos de controle da infecção pelo *M. tuberculosis* citados acima.



**Figura 2: Processos envolvidos na infecção, no curso da doença e nos mecanismos imunes ativados durante a infecção pelo *M. tuberculosis*.** Quando as micobactérias alcançam o espaço alveolar são engolfadas por macrófagos e por células dendríticas. Estas células produzem IL-12 responsável por ativar células T. As células T ativadas migram para o foco da infecção auxiliando na formação do granuloma e produzem IFN- $\gamma$  que age em sinergia com o TNF- $\alpha$  opsonizando a atividade dos macrófagos. Algumas células T ativadas também secretam perforinas e granulinas que têm a função de eliminar os bacilos dentro dos macrófagos. Uma vez que a comunicação entre macrófagos e células T é prejudicada, granulomas não mais conterão as micobactérias causando a sua disseminação (Adaptado de Kaufmann, 2002).

Apesar da resposta granulomatosa ser eficaz em combater a disseminação do bacilo no organismo, é importante ressaltar que essa resposta inflamatória, persistente em alguns indivíduos, pode ocasionar a confluência dos granulomas gerando grandes áreas de necrose. Com isso, os tecidos são destruídos levando a conseqüentemente falência do órgão afetado (Cosma et al., 2003).

Como foi constatado, a resposta imune mediada por células possui um papel central para o controle da infecção. Como o *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular pode-se pensar que a imunidade humoral não contribui para a proteção. Entretanto, quando a doença é disseminada para outros órgãos, anticorpos específicos contra os bacilos que estão localizados no meio extracelular podem ser detectados. Os anticorpos se ligam as micobactérias e a fagocitose desses bacilos opsonizados (envolvidos pelos anticorpos) aumenta a capacidade microbicida de células fagocíticas e estimula a resposta imune celular (Hoft, 2008).

Sendo assim, três considerações gerais a respeito da resposta imune contra o *M. tuberculosis* podem ser feitas:

(i) Embora as diferentes populações de células T sejam requeridas na indução de uma resposta imune eficaz, as células T CD4<sup>+</sup> são as principais responsáveis pela geração dessa resposta, seguida das células T CD8<sup>+</sup> (Kaufmann, 2004).

(ii) A citocina IL-12 produzida pelos macrófagos ativado pelo contato com o bacilo, diferencia as células T CD4<sup>+</sup> que estão no sítio da infecção em efetores do tipo Th1. Além disso, IL-12 participa do processo de ativação das células NK. As células T CD4<sup>+</sup> Th1 e as células NK ativadas passam a produzir IFN- $\gamma$ , a qual juntamente com TNF- $\alpha$ , ativa as funções microbicidas dos macrófagos. A produção dessas citocinas é essencial para o controle da infecção (Cooper et al., 1993; Salgame, 2005).

(iii) Apesar das células T serem os principais mediadores da proteção contra a TB, as funções efetoras são principalmente desempenhadas pelos macrófagos. A interação entre as células T e os macrófagos induz a formação de granulomas, estruturas que fazem com que a disseminação e a replicação micobacteriana seja controlada. Uma vez que essa comunicação é prejudicada, os granulomas não mais conseguem conter as micobactérias e estas se espalham pelos outros órgãos e até mesmo para o ambiente (Kaufmann, 2004).

## II.2.2 TRATAMENTO E PROFILAXIA

A descoberta da penicilina por Fleming em 1928 inaugurou uma nova era na medicina – a era dos antibióticos. Esse fármaco se mostrou eficaz no tratamento de várias doenças causadas por bactérias que até então não tinham cura. O uso da penicilina, no entanto, se mostrou curiosamente ineficaz contra a tuberculose (Souza & Vasconcelos,

2005). A partir disso, a comunidade científica começou a buscar outros produtos que pudessem tratar a enfermidade.

O primeiro antibiótico capaz de inibir *in vitro* o crescimento do *M. tuberculosis* foi a actinomicina, substância produzida por algumas espécies de *Streptomyces*. Descoberta nos anos 30 logo depois da penicilina, esse medicamento se mostrou ser muito tóxico para animais e humanos. A descoberta em 1943 da estreptomina, substância produzida também por um microrganismo, foi um grande avanço na luta contra a TB. Como possui baixa toxicidade, o seu uso foi permitido em humanos atuando de maneira eficaz no combate à tuberculose (Souza & Vasconcelos, 2005; Lugo & Bewley, 2008).

Nas décadas de 50 e 60 foram introduzidas várias drogas anti-TB como a isoniazida (INH), a cicloserina, a rifamicina, a pirazinamida (PZA) e o etambutol (EMB). Dentre os antibióticos utilizados, a rifamicina, um produto natural originado da bactéria *Amycolatopsis mediterranei*, se destaca, pois serviu como matéria prima para o desenvolvimento da rifampicina (RIF). Hoje em dia, a RIF é a uma das drogas mais importantes no tratamento da TB (Frieden & Driver, 2003).

A quimioterapia padrão contra a TB recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é denominada de TCPDO (Tratamento de Curto Prazo Diretamente Observado), mais conhecida como "DOT" (Directly Observed Treatment). Esta estratégia consiste em dois meses de tratamento com a administração das drogas anti-TB de primeira geração (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol), seguida por outra fase com a administração de isoniazida e rifampicina por mais quatro meses, totalizando seis meses de tratamento (Who, 2005). Entretanto, a infecção com linhagens de micobactérias multi-drogas resistentes (MDR-TB) e, mais recentemente, extensivamente resistentes (XDR-TB), torna o tratamento mencionado acima pouco eficaz. Sendo assim, os acometidos são tratados com as drogas de segunda geração (canamicina, amicacina, cicloserina, dentre outras). Um dos inconvenientes da utilização das drogas de segunda geração é a sua alta toxicidade para o paciente. Aliado a isso, o longo período de tratamento exigido (no mínimo seis meses) acaba resultando no abandono do mesmo, tendo reflexos importantes no controle da doença e no aparecimento de bacilos resistentes (Silva, 1999; Zhang, 2005).

Além da quimioterapia convencional, a TB pode ser controlada utilizando-se a BCG (Bacillus Calmette-Guérin), única vacina disponível para uso clínico. Ela foi e continua sendo largamente utilizada em programas de vacinação contra a tuberculose e estima-se que cerca de 3 bilhões de pessoas já tenham sido vacinadas (Martin, 2005).

A BCG foi desenvolvida no Instituto Pasteur por dois pesquisadores, Albert Calmette e Camille Guérin. Eles fizeram várias passagens de uma linhagem virulenta de *M. bovis* em meio de cultura por 13 anos. Após esse tempo, observou-se que o microrganismo não causava mais lesões tuberculosas e conferia proteção a animais frente ao desafio com



linhagens virulentas do bacilo (Liu et al., 2009). Posteriormente, a vacina começou a ser administrada em recém-nascidos e foi distribuída pelo Instituto Pasteur para laboratórios de todo o mundo. O Brasil iniciou em 1927 seus programas de imunização com a BCG que foram implantados principalmente por Arlindo de Assis, com o apoio da *Liga Brasileira Contra a Tuberculose* (Hijjar et al., 2007).

Embora venha sendo amplamente utilizada no Brasil e em outros países, a eficácia da BCG permanece controversa. Verificou-se que a vacina é capaz de proteger crianças contra as formas mais severas de TB, incluindo a meningite tuberculosa (Liu et al., 2009). Em contraste, a eficácia da vacina em pacientes adolescentes e adultos acometidos com a TB pulmonar varia de 0 a 80%, dependendo da população estudada (Britton & Palendira, 2003; Liu et al., 2009). As diferenças genótípicas e de idade das populações bem como fatores ambientais e a dose da vacina empregada podem explicar esse fenômeno (Brewer, 2000; Smith et al., 2000). Foi visto por meio de análises de genômica comparativa que as diferentes linhagens de BCG utilizadas no mundo possuem composição genética distinta (Behr, 2001). Essa heterogeneidade genética é provavelmente causada pelos diferentes mecanismos de atenuação que cada linhagem sofre em diferentes regiões do mundo (Liu et al., 2009).

Por ser uma vacina viva, a BCG apresenta risco de reversão da patogenicidade, o que limita o seu uso em pacientes imunocomprometidos. Esse fato é essencialmente grave se considerarmos que no caso da TB a co-infecção pelo HIV tem se tornado cada vez mais comum. Além disso, ela interfere com uma importante ferramenta de diagnóstico para TB, o teste da tuberculina, também conhecido como PPD (Derivado Protéico Purificado). Diante dos motivos expostos acima, faz-se necessária a pesquisa e o desenvolvimento de novas vacinas seguras e mais eficazes (Gupta et al., 2007).

#### *II.2.2.1 Vacinas contra TB em desenvolvimento*

Com a caracterização de muitas proteínas codificadas pelo genoma das micobactérias foi possível identificar inúmeros antígenos imunogênicos e/ou imunodominantes como promissores candidatos ao desenvolvimento de vacinas mais eficazes que a BCG. Nos últimos anos, mais de 200 vacinas foram testadas. Entre elas estão (i) as vacinas baseadas em linhagens de micobactérias atenuadas ou inativadas (ii) vacinas de subunidade (iii) vacinas baseadas em microrganismos vivos recombinantes e (iv) vacinas gênicas. Muitas dessas vacinas encontram-se em fase de ensaio clínico (Reed & Lobet, 2005; Ginsberg, 2002).

## II.2.2.1.1 Vacinas baseadas em linhagens de micobactérias atenuadas ou inativadas

Os processos de atenuação de virulência tradicionalmente utilizados baseiam-se em passagens dos microrganismos em placas de cultura sob diferentes condições, levando ao surgimento de mutantes menos virulentos, como no caso da BCG. Entretanto, o avanço da biologia molecular possibilitou conhecer o genoma de microrganismos patogênicos permitindo a identificação e a inativação de genes responsáveis pela virulência e patogenicidade visando à construção de novas vacinas. Linhagens atenuadas de *M. microti* e *M. tuberculosis* foram testadas e sua utilização em ensaios *in vivo* geraram resultados muito satisfatórios (Manabe et al., 2002; Martin et al., 2006; Gupta et al., 2007).

*M. microti* é capaz de infectar somente pequenos roedores, mas pode causar doenças em outros animais quando administrada em altas doses. Apesar de seu genoma ser similar ao de *M. tuberculosis*, análises cromossômicas revelaram que *M. microti* não possui alguns genes que estão presentes em linhagens virulentas de *M. tuberculosis*. Por serem naturalmente atenuadas, as linhagens foram testadas como vacinas em mais de 10.000 humanos. Os resultados mostraram que essa vacinação gerou uma proteção comparável com a BCG. Contudo, *M. microti* foi abandonada por motivos que ainda permanecem obscuros (Manabe et al., 2002).

Outra estratégia utilizada foi o desenvolvimento de mutantes auxotróficos de *M. tuberculosis*. Essas linhagens expressam todos os antígenos das linhagens virulentas, incluindo vários antígenos ausentes na BCG. No entanto, elas não podem persistir *in vivo*, pois os genes que codificam enzimas metabólicas essenciais à sua sobrevivência estão nocauteados (Hoft, 2008). Essas vacinas se mostraram seguras quando testadas em camundongos da linhagem SCID, porém, testes em humanos ainda não foram conduzidos devido à falta de segurança e problemas de estabilidade (Gupta et al., 2007).

Camundongos BALB/c vacinados com linhagens SO2 de *M. tuberculosis*, que possuem o fator de virulência *phoP* não-funcional, apresentaram níveis superiores de proteção em relação aos que foram vacinados com a BCG (Martin et al., 2006). Testes utilizando esse mutante estão sendo conduzidos e os estudos demonstraram que o mutante é capaz de persistir no organismo do hospedeiro sem lhe causar danos teciduais (Gonzalo-Asensio et al., 2008).

O desenvolvimento de vacinas atenuadas é um processo bastante trabalhoso devido às dificuldades encontradas em se alcançar um nível seguro de atenuação. Para evitar o perigo de reversão da patogenicidade, especialmente em pacientes com HIV, foram desenvolvidas linhagens de *M. vaccae* inativadas. A preparação de *M. vaccae* inativada por calor induziu forte proteção em camundongos desafiados com *M. tuberculosis*. Atualmente essa vacina encontra-se em fase de ensaio clínico III (Hoft, 2008).

### II.2.2.1.2 Vacinas de subunidade

O desenvolvimento de vacinas de subunidade só foi possível após a identificação de antígenos de *M. tuberculosis* capazes de induzir respostas imunes apropriadas. Uma vez identificados, os fragmentos antigênicos (elementos da parede do bacilo, moléculas secretadas como proteínas, carboidratos e glicolípídeos) foram purificados e testados contra a TB. Apesar de serem seguras, essas vacinas exigem alto custo de produção e são pouco imunogênicas sendo necessário administrá-las com adjuvantes, substâncias capazes de potencializar a resposta imune (Baumann et al., 2006; Sable et al., 2007).

As proteínas secretadas por *M. tuberculosis* nos primeiros estágios de infecção são consideradas alvos para a fabricação de vacinas, pois presumivelmente elas são as primeiras a estabelecerem um contato com o sistema imunológico do hospedeiro. Exemplos são as proteínas Ag85B, TB10.4, a proteína de 6 kDa - ESAT-6, Mtb32, Mtb39, dentre outras. Frações purificadas de algumas dessas proteínas têm sido utilizadas em ensaios de imunização e têm se mostrado eficazes em gerar uma resposta imune efetiva contra a TB (Kamath et al., 2008; Olsen et al., 2004).

A proteína Ag85B, relatada como sendo um dos principais alvos para as células T, foi capaz de induzir proteção parcial em camundongos e proteção total em porcos-da-índia desafiados com linhagens virulentas de *M. tuberculosis* (Mustafa et al., 2000; Yadav et al., 2001; Olsen et al., 2004). Camundongos recém-nascidos e adultos que receberam a proteína Ag85B fusionada a ESAT-6, quando misturadas ao adjuvante IC31<sup>®</sup>, também demonstraram resposta imune protetora contra o bacilo (Kamath et al., 2008). A construção ESAT6/Ag85B foi bem sucedida tanto em camundongos quanto em primatas (Baumann et al., 2006).

Dietrich et al. (2005) reportaram que a vacinação com a proteína imunodominante TB10.4 induziu forte proteção em modelo murino. Quando fusionada a Ag85B, induziu proteção contra a TB comparável àquela induzida por Ag85B/ESAT-6 e BCG.

A vacina de subunidade Mtb72F, composta por dois antígenos, Mtb32 e Mtb39, mostrou proteção contra a TB em camundongos (Skjot et al., 2000), porcos-da-índia (Reed et al., 2003) e coelhos (Tsenova et al., 2003). Estudos posteriores revelaram que essa vacina induziu a produção de células Th1 protegendo macacos desafiados com *M. tuberculosis* (Langermans et al., 2005; Reed & Lobet, 2005).

Estão sendo pesquisados também antígenos expressos durante a fase latente do bacilo dentro do organismo (Baumann et al., 2006) assim como novas estratégias que visam aperfeiçoar a entrega dos antígenos *in vivo* (ex: uso de microesferas e lipossomas que estimulam a resposta imune) (Evans et al., 2004).

### II.2.2.1.3 Vacinas baseadas em microrganismos vivos recombinantes

Os mesmos antígenos micobacterianos que são utilizados para a fabricação de vacinas de subunidade estão também sendo expressos em microrganismos geneticamente modificados tais como o vírus vaccinia Ankara (MVA), adenovírus, BCG e outros vetores virais e bacterianos. A vantagem de se utilizar vetores vivos para a entrega de antígenos é que os mesmos possuem efeitos adjuvantes potentes, são capazes de estimular tanto resposta imune de mucosa quanto sistêmica e são aptos a sintetizar antígenos *in vivo* aumentando a magnitude da resposta imune (Hoft, 2008).

O vírus MVA expressando Ag85A foi utilizado com sucesso em ensaios clínicos fase I no Reino Unido e no Gâmbia gerando indução de respostas T CD4+ especialmente quando administrados em pessoas previamente vacinadas com a BCG (McShane et al., 2004).

Apesar da eficácia duvidosa da BCG, esta vacina ainda permanece como a melhor alternativa de imunização uma vez que possui características interessantes, como, por exemplo, ser bastante imunogênica e ter sido empregada por tanto tempo, o que gera segurança acerca de seu uso. Esses fatores contribuem fortemente para que os grupos de pesquisa se voltem para o desenvolvimento de vacinas recombinantes baseadas na BCG, com a tentativa de melhorar a sua antigenicidade (Gupta et al., 2007).

Um candidato promissor para o desenvolvimento de uma nova vacina é a rBCG $\Delta$ ureC:hly (VPM1002). Essa linhagem foi modificada de maneira a produzir uma lisina (HLY) de *Listeria monocytogenes* permitindo que a BCG escape do fagossomo e seja apresentada mais eficientemente para linfócitos T CD8+ (Grode et al., 2005). Camundongos imunizados com VPM1002 foram protegidos contra desafios com a linhagem laboratorial de *M. tuberculosis* e também contra um isolado clínico de Beijing/W (Glynn et al., 2002). No final de 2008, essa vacina entrou em ensaio clínico fase I.

A BCG de Tóquio expressando Ag85A é também uma promissora vacina contra a TB, demonstrando proteção em macacos cynomolgus e em macacos rhesus (Sugawara et al., 2007; Sugawara et al., 2009). Linhagens de BCG capazes de sintetizar o antígeno Ag85C também foram desenvolvidas e se mostraram capazes de modular o sistema imune de porcos-da-índia aumentando os níveis de células Th1 os protegendo contra o desafio com *M. tuberculosis* virulenta (Jain et al., 2008). Recentemente, outra vacina utilizando BCG recombinante foi desenvolvida por Qie e colaboradores (2008). Essa vacina expressa os antígenos micobacterianos Ag85B–mpt64<sub>190–198</sub>–mtb8.4 fusionados e suscitou respostas imunes mais duradouras que a BCG convencional. Outro exemplo são as BCG's expressando perfringolisina (AFRO-1) desenvolvidas por Magalhães e colaboradores (2008). Macacos Rhesus imunizados com AFRO-1 e posteriormente com adenovírus

expressando Ag85A, Ag85B e TB10.4, revelaram presença de forte resposta imune mediada por células T.

#### II.2.2.1.4 Vacinas gênicas

As vacinas de DNA são as mais recentes formas de vacina e apresentam uma interessante alternativa para a apresentação de moléculas antigênicas para o sistema imune. Elas consistem na administração de um plasmídeo bacteriano dentro do hospedeiro que contém um cassete de expressão eucariótico responsável por codificar o antígeno de interesse, possibilitando a geração de antígenos *in vivo*. Outra característica interessante é que elas possuem adjuvantes endógenos chamados “motivos CpG” (citosina-fosfato-guanina não metiladas), responsáveis por aumentar a magnitude da resposta imune (Gurunathan et al., 2000). Além disso, são estáveis e apresentam baixo custo de produção. Desta forma, elas têm se apresentado como promissoras estratégias contra patógenos intracelulares que são refratários ao sistema imune e à quimioterapia.

Em 1992, Tang e colaboradores demonstraram que a injeção de plasmídeos de DNA em cobaias podia induzir respostas imunes. No ano seguinte, outros dois grupos de pesquisa (Ulmer et al., 1993; Robinson et al., 1993) revelaram que o inóculo de plasmídeos codificando o antígeno da influenza em animais os protegeu contra o desafio com o vírus causador da doença (Jun-Ming & Dao-yin, 2006).

Os primeiros dados mostrando proteção significativa contra TB através da inoculação de vacinas gênicas em animais utilizaram DNA nu (“naked DNA”). A eficácia dessa forma de vacinação foi primeiramente relatada por Tascon et al. e Huygen et al. em 1996. Subseqüentemente, outras vacinas de DNA codificando vários antígenos micobacterianos mostraram proteção contra a infecção por *M. tuberculosis* (Jun-Ming & Dao-yin, 2006).

Plasmídeos expressando o antígeno ESAT-6 foram efetivos em reduzir a quantidade de *M. tuberculosis* no pulmão de animais infectados com o bacilo (Lowrie et al., 1999). Ha e colaboradores (2003) reportaram que as vacinas de DNA codificando o antígeno Ag85A foram capazes de prevenir a reativação de TB em camundongos quando administradas juntamente com a quimioterapia convencional. Em 2008, Liang e colaboradores demonstraram que a vacina de DNA Ag85A associada com rifampicina foi eficaz para o tratamento de camundongos infectados com linhagens MDR de *M. tuberculosis*. Esses resultados são animadores e aparecem como uma alternativa viável para tentar resolver o problema da resistência em países em desenvolvimento.

Apesar de inúmeros trabalhos terem demonstrado a habilidade das vacinas de DNA em induzir a proliferação de células do sistema imune e proteger camundongos, foi observado que elas apresentam-se fracamente imunogênicas quando administradas em

animais de grande porte e em humanos. Um dos motivos seria a ação de nucleases de restrição endógenas que degradam o plasmídeo e evitam o surgimento de uma resposta imune eficiente. Existe também uma certa insegurança que o DNA introduzido artificialmente possa se integrar ao genoma do hospedeiro e causar doenças auto-imunes (Li & Zhu, 2006).

Afora estes obstáculos, grandes esforços têm produzido progressos nessa área. Um importante fator que deve ser levado em consideração a respeito das vacinas de DNA e a escolha do antígeno. A maioria das vacinas construídas até então foram baseadas em proteínas que são secretadas por *M. tuberculosis* tais como ESAT-6, Ag85 ou em proteínas do choque térmico (*Heat Shock Proteins: HSP's*). De uma forma geral, as HSP's produziram resultados promissores e diante dos diversos efeitos estimulantes sobre o sistema imunológico, elas são consideradas antígenos potenciais a serem utilizados na profilaxia contra os mais variados agentes infecciosos, incluindo *M. tuberculosis*.

### **II.3. Proteínas do choque térmico (HSPs)**

#### **II.3.1. HSP'S: CONCEITOS GERAIS**

Todos os organismos respondem ao calor induzindo a síntese de um grupo de proteínas altamente conservadas chamadas de proteínas do choque térmico (*Heat Shock Proteins: HSP's*). Essa resposta foi observada em bactérias, fungos, plantas e animais. Além do calor, outros estresses podem induzir a produção das HSP's tais como falta de oxigênio, presença de etanol e metais pesados no meio. Essas proteínas também podem ser encontradas em condições normais de temperatura, embora em menor quantidade, e desempenham um papel vital no funcionamento normal da célula (Lindquist, 1986; Lindquist, 1988).

Também conhecidas como chaperonas, as HSP's auxiliam na conformação tridimensional de proteínas recém-formadas, e com isto impedem a formação de proteínas com conformação tridimensional inadequada. Após o estresse, as HSP's reparam as proteínas mal formadas ou promovem a sua degradação (Netzer et al., 1998; Jolly et al., 2000). Além de atuar como chaperonas, elas realizam outras funções mais especializadas, como o controle transcricional (Xing et al., 2004) e o controle de apoptose (Takayama et al., 2003).

As HSP's são classificadas, principalmente, em seis famílias de acordo com o seu peso molecular: Hsp10, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp100. Apesar de serem mais referidas como proteínas citosólicas, elas podem estar presentes na parede celular ou podem também ser secretada pela célula (Gullo & Teoh, 2004).

As HSP's localizadas intracelularmente protegem a célula favorecendo sua sobrevivência em condições letais. Quando ancoradas à membrana ou secretadas, essas proteínas são capazes de interagir com células do sistema imune mediando respostas imunológicas, o que as torna alvo para o desenvolvimento de vacinas (Schmitt et al., 2007).

### II.3.2. HSP'S COMO ANTÍGENOS VACINAIS

As HSP's têm sido descritas na literatura como principais antígenos de muitos patógenos. Algumas dessas proteínas funcionam como potentes indutores da imunidade inata e adaptativa. Elas ativam células dendríticas e células NK, aumentam a capacidade de apresentação de antígenos a células efectoras (T) melhorando a resposta imune humoral e celular. Neste contexto, tais funções, desempenhadas pelas HSP's, estão sendo exploradas para o desenvolvimento de vacinas contra doenças infecciosas (Segal et al., 2006).

As HSP's derivadas de patógenos são as primeiras proteínas a serem sintetizadas após os primeiros contatos com o hospedeiro, pois, como são chaperonas, elas auxiliam na sobrevivência do microrganismo dentro do organismo. Dessa maneira, as HSP's são os primeiros antígenos a serem reconhecidos pelo sistema imune e agem, portanto, como imunoestimulantes. Outra característica intrigante é a imunodominância das HSP's. Sendo proteínas muito conservadas, uma mesma célula de memória é capaz de reconhecer epítomos de diferentes HSP's. Além disso, diante de situações de estresse, as células do próprio hospedeiro respondem aumentando os níveis de expressão de suas HSP's, as quais também se tornam disponíveis para o reconhecimento pelo sistema imunológico (Eden et al., 2005; Segal et al., 2006).

Várias HSP's de diferentes patógenos foram apresentadas ao sistema imune e interessantes resultados foram obtidos. Kang e colaboradores (2004) demonstraram que a Hsp70 derivada do protozoário *Toxoplasma gondii* induziu a maturação de células dendríticas e estimulou a produção de IL-12 no hospedeiro. Quando Noll & Autenrieth (1996) imunizou animais com Hsp60 de *Yersinia enterocolitica* os mesmos foram protegidos após o desafio com a linhagem virulenta deste microrganismo.

Em 1994, Silva e colaboradores utilizaram pela primeira vez a proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae*, antigeneticamente muito similar à Hsp65 de *M. tuberculosis* (Lowrie et al., 1994), como antígeno para o desenvolvimento de uma vacina contra a TB. A partir de então, muitos trabalhos foram publicados relatando as vantagens de se utilizar uma vacina de DNA baseada no gene Hsp65 de *M. leprae* como antígeno contra a infecção por *M. tuberculosis* (Bonato et al., 1998; Souza et al., 2008). Dessa maneira, pode-se sugerir que o Hsp65 seria um potencial antígeno candidato para o desenvolvimento de uma nova vacina contra a TB.

### II.3.3. HSP65 DE *Mycobacterium leprae* E A TUBERCULOSE

Estudos envolvendo células transfectadas com um vetor retroviral contendo a ORF Hsp65 de *M. leprae* induziram proteção contra desafio com linhagem virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv, em modelo experimental (Silva & Lowrie., 1994). Em seguida, quando somente plasmídeos contendo a ORF Hsp65 foram inoculados em camundongos, percebeu-se que eles foram capazes de proteger esses animais contra subsequente desafio com *M. tuberculosis*. Essa vacina de DNA-*hsp65* quando administrada por via intramuscular ou endovenosa em camundongos infectados com *M. tuberculosis* apresentou efeitos profiláticos e terapêuticos em vários modelos animais (Lowrie et al., 1999; Silva, 1999; Bonato et al., 2004). Os efeitos benéficos observados foram associados à participação de células T CD4+ e T CD8+ características do perfil Th1 de resposta (Bonato et al., 1998; Lowrie & Silva, 2000).

Entretanto, esta vacina, utilizada como DNA nu (“naked DNA”) e administrada mais comumente por via intramuscular, requeria múltiplas doses de grandes quantidades de plasmídeo, pois estava provavelmente sendo degradada *in vivo* por endonucleases de restrição (Lowrie et al., 1997). Com o intuito de diminuir a dose da vacina Souza e colaboradores (2008) testaram diferentes vias de administração, incluindo a administração em camundongos de lipossomas contendo DNA-*hsp65*. Essa estratégia demonstrou ser a mais efetiva e promissora, já que pequenas doses de DNA foram suficientes para gerar proteção contra *M. tuberculosis* virulenta.

Com o intuito de aumentar a imunogenicidade de sua vacina de DNA também baseada no Hsp65, Changhong e colaboradores (2009) fusionou esse antígeno ao gene que codifica a interleucina-2 humana, citocina que estimula a proliferação de linfócitos T citotóxicos. A administração de DNA-*hsp65-IL-2* induziu respostas Th1 demonstrando efeitos profiláticos e terapêuticos em camundongos vacinados. Entretanto, essa vacina não foi mais eficaz quando comparada à vacina DNA-*hsp65* desenvolvida por Silva e colaboradores (1994).

A maioria das vacinas de DNA-*hsp65* já desenvolvidas foram projetadas para serem administradas por via parenteral. No entanto, além de se tratar de uma rota invasiva, vacinas administradas dessa maneira são pouco eficientes em estimular o sistema imune associado às mucosas, sendo efetivas somente contra patógenos que penetram pela rota sistêmica do organismo (Eriksson & Holmgren, 2002). Diante disso, e considerando que o primeiro contato de *M. tuberculosis* é estabelecido através da mucosa nasal, sistemas de apresentação de antígenos diretamente à superfície de mucosas representam uma alternativa mais adequada para o desenvolvimento de uma nova vacina contra a TB.



#### II.4. A imunidade de mucosas e a TB

O epitélio da mucosa constitui uma barreira física e química que separa o meio corporal interno do externo. As células epiteliais possuem sensores que detectam perigosos agentes ou produtos microbianos. Após o reconhecimento de substâncias nocivas ao organismo, elas secretam citocinas e quimiocinas para células dendríticas e macrófagos ativando, assim, a resposta imune inata. Sendo assim, as mucosas representam a primeira linha de defesa contra os microrganismos que utilizam esse meio de entrada (Kagnoff & Eckmann, 1997; Izadpanah et al., 2001).

A indução de respostas imunes contra antígenos exógenos, microrganismos e vacinas requerem a presença de tecidos linfóides bem organizados. A prevenção de infecções no trato respiratório superior é mediado pelos tecidos linfóides associados à nasofaringe (NALT - *Naso-pharynx-associated lymphoid tissue*). No trato respiratório inferior as infecções são prevenidas pelo BALT (*Bronchus-associated lymphoid tissue*), no trato gastrointestinal elas são combatidas pelo GALT (*Gut-associated lymphoid tissue*). Os tecidos linfóides associados à mucosa (NALT, BALT e GALT) contêm células especializadas, chamadas de células M, que têm como função interagir, capturar e transportar os antígenos e pequenos parasitas levando-os até as células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas) (Perdigón et al., 2001; Hobson et al., 2003).

O NALT contém células M, células dendríticas e linfonodos cervicais (LC). Os LC são esquematicamente divididos em córtex e medula. Na região cortical estão presentes os folículos linfóides, com seu centro germinativo, no qual se encontram os linfócitos B. Na região medular estão localizados os linfócitos T (Hobson et al., 2003; Chammas et al., 2004). As células dendríticas interagem com os antígenos e os apresentam às células T localizadas nos linfonodos cervicais estabelecendo uma comunicação entre imunidade inata e adaptativa. As células T ativadas secretam citocinas estimulando os linfócitos B. Os antígenos T-independentes são capazes de se ligar aos receptores de imunoglobulinas das células B ativando-as. Por fim, as células T e B unidas criam uma poderosa linha de defesa contra o agente infeccioso (Hobson et al., 2003; Kutzler & Weiner, 2008).

Uma importante característica da resposta imune adaptativa das mucosas é a produção de anticorpos do tipo IgA por plasmócitos. A IgA é a principal classe de anticorpos que pode ser eficientemente secretada através dos epitélios e desempenha papel crítico, pois neutraliza a nocividade de organismos patogênicos (Macpherson et al., 2001). Uma das funções exercidas por esses anticorpos é a capacidade de aprisionar microrganismos invasores no muco prevenindo o contato direto do patógeno com a superfície da mucosa (Lamm, 1997).

As imunizações intranasais podem estimular resposta imune nas glândulas mamárias, no trato respiratório superior, na vagina e até mesmo no intestino de animais imunizados. Dados na literatura sugerem que essa rota de imunização é mais efetiva quando comparada às imunizações oral, intestinal e genital (Hobson et al., 2003).

As diferentes rotas de imunização que vêm sendo testadas apresentam diferentes habilidades em induzir resposta imune humoral e celular (Hopkins et al., 1995; Mercenier et al., 2000). É também interessante associar a via de imunização com o tipo de patógeno que se quer combater. Por exemplo, induzir resposta de IgA nas mucosas do reto e da vagina seria de grande importância na proteção contra patógenos sexualmente transmissíveis, enquanto que a secreção de IgA no pulmão poderia promover proteção contra infecções respiratórias (Hopkins et al., 1995), como no caso da TB. Dessa maneira, o desenvolvimento de sistemas de apresentação de antígenos à superfície de mucosas nasais é um importante fator a ser estudado no caso da TB, uma vez que o início da infecção se dá pelo contato do *M. tuberculosis* à superfície pulmonar.

## **II.5. Utilização de bactérias vivas como vacinas de mucosa**









Estratégias que visam combater patógenos presentes na superfície das mucosas podem ser o único meio de prevenir uma infecção. Uma importante contribuição para o desenvolvimento de novas vacinas de mucosa consiste na utilização de bactérias e vírus, geneticamente modificados, capazes de produzir e apresentar antígenos heterólogos (Medina & Guzman., 2001). O uso de bactérias como carreadores têm algumas vantagens sobre o uso de vírus, uma vez que estes possuem limitações quanto ao tamanho do material genético que pode ser carregado pela partícula viral (Bermúdez-Humarán et al., 2004).

Dois tipos de carreadores bacterianos são usados para estimular a imunidade em nível de mucosa: (i) bactérias patogênicas atenuadas e (ii) bactérias não patogênicas. As primeiras foram as mais estudadas e o seu uso é muito interessante já que são bem adaptadas para interagir com a superfície das mucosas, pois a maioria utiliza essas superfícies como sítio de início da infecção. Contudo, esses organismos apresentam riscos de reversão da patogenicidade, não sendo totalmente seguros para uso humano, especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos. Linhagens atenuadas de *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Bordetella* e *Listeria* estão entre os patógenos atenuados mais utilizados como carreadores de antígenos (Brahmbhatt et al., 1992; Curtiss et al., 1994; Killeen et al., 1999; Stevenson & Roberts., 2003). Os problemas relacionados ao uso desses microrganismos poderiam ser solucionados através da utilização de bactérias não patogênicas e comensais, tal como as bactérias lácticas (BL).

As BL compõem um grupo de microrganismos Gram-positivos que incluem espécies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus*, dentre outras. O ser humano, desde tempos mais remotos, utiliza essas bactérias para a fabricação vários tipos de alimentos como, por exemplo, queijos, vinhos, iogurtes e leites fermentados. Por serem utilizadas há séculos em processos de fermentação e preservação de alimentos elas são consideradas seguras (“GRAS” - Generally Recognized As Safe). Algumas espécies são também importantes membros da microbiota humana (Steidler & Rottiers, 2006; Wells & Mercenier, 2008).

Recentemente, as BL vêm sendo utilizadas como veículo para a apresentação de antígenos exógenos na superfície de mucosas. Além do status “GRAS” algumas espécies desse grupo são capazes de aumentar a quantidade de IgA nas mucosas e estimular o sistema fagocítico do hospedeiro (Neutra & Kozlowski, 2006). As BL são também pouco imunogênicas, ao contrário dos microrganismos patogênicos e podem ser continuamente utilizadas em programas de imunização. Outra propriedade atraente dessas bactérias é que elas não possuem LPS em sua parede celular, o que elimina os riscos de choque por endotoxina (Mercenier et al., 2000).

Neste contexto, vários grupos de pesquisa voltaram-se para o uso potencial das destas bactérias como “usinas celulares” para a produção de moléculas de interesse médico e biotecnológico, como citocinas, enzimas, alérgenos e antígenos (Fig. 3) (Nouaille et al., 2003; Bermúdez-Humarán et al., 2004).

| PRODUTOS  | MODELOS   | APLICAÇÕES                                     |
|---|---|--|
| Antígenos  |  | Vacinas  |
| Citocinas  |  | Doenças inflamatórias, adjuvante de vacinas    |
| Enzimas    |  | Suprimento de enzimas deficientes no organismo |
| Alérgenos  |  | Terapia e prevenção de alergias                |

**Figura 3: Aplicações recentes das BL recombinantes.** As BL são capazes de expressar várias moléculas de interesse para o desenvolvimento de vacinas e para a terapia de doenças (Adaptado de Wells & Mercenier, 2008).

#### II.5.1 *Lactococcus lactis*, A BL MODELO

Dentre todas as BL, *L. lactis* é a espécie mais bem caracterizada e figura como organismo modelo no estudo das mesmas; não só pela sua importância econômica, mas

também devido ao fato de: (i) ser um microrganismo de fácil manipulação; (ii) ser “GRAS”; (iii) ter sido a primeira BL cujo genoma foi seqüenciado (Bolotin et al., 2001) e (iv) possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (de Vos & Simons, 1994; Duwat et al., 2000; Bolotin et al., 2001).

Essa bactéria ainda apresenta outras propriedades interessantes que a torna ideal para a produção de moléculas exógenas. *L. lactis* não produz endotoxinas ou qualquer outro produto metabólico tóxico (Bolotin et al., 2001) além de apresentar poucas proteínas secretadas, sendo que apenas uma, Usp45 (Unknown Secreted Protein of 45 kDa) é secretada em quantidades suficientes para ser detectada em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) corado pela técnica “azul de Commassie” (van Asseldonk et al., 1990). Além disso, as linhagens mais utilizadas em laboratório (IL1403 e MG1363) são desprovidas de plasmídeos selvagens e não produzem proteases extracelulares (Gasson et al., 1983; Chopin et al., 1984).

#### *II.5.1.1. Expressão de proteínas heterólogas em L. lactis*

A expressão de proteínas heterólogas em *L. lactis* foi alcançada tanto pelo desenvolvimento do conhecimento genético quanto pelo desenvolvimento de técnicas de biologia molecular. Através deste dueto e a fim de obter níveis elevados e controlados de produção, vários vetores contendo promotores constitutivos ou indutivos foram desenvolvidos e hoje constituem a base de todos os sistemas de expressão voltados para *L. lactis* (Nouaille et al., 2003).

Dentre os sistemas de expressão disponíveis para *L. lactis*, certamente o NICE (Nisin Controlled Expression) é o mais utilizado. Esse sistema é baseado na combinação do promotor  $P_{nisA}$  com os genes regulatórios *NisRK* (Wells et al., 1993). Na presença de nisina, um peptídeo antimicrobiano utilizado na indústria alimentícia como conservante, o promotor  $P_{nisA}$  induz a transcrição da molécula de interesse (Bermúdez-Humarán et al., 2004). Muitas proteínas exógenas foram expressas em *L. lactis* por meio desse sistema (de Ruyter et al., 1996).

Contudo, para que algumas das proteínas produzidas (enzimas e antígenos) por estas bactérias tenham a atividade biológica desejada é preciso que após sua síntese, estas moléculas sejam corretamente endereçadas ao seu destino final: (i) citoplasma, (ii) membrana ou (iii) meio extracelular. A produção intracelular protege a proteína de condições ambientais adversas (como por exemplo, o baixo pH do estomago o qual estão expostos após a administração oral da bactéria), porém, a lise celular será necessária para a entrega do mesmo. Já a expressão do antígeno ancorado à parede celular, além de permitir a interação com o ambiente, também limita a sua possível degradação por proteases.

Finalmente, a secreção do antígeno permitirá a sua liberação para o meio externo, direcionando assim a interação deste com o ambiente (trato digestivo, por exemplo). (Bermúdez-Humarán et al., 2004).

Assim, vários sistemas de expressão e de endereçamento celular de proteínas heterólogas em diferentes localizações celulares já foram desenvolvidos não só para uso em *L. lactis*, mas também em outras BL (Norton et al., 1995; Dieye et al., 2001).

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um novo sistema de expressão e endereçamento protéico para uso em *L. lactis*. O sistema, denominado XIES (*Xylose-Inducible Expression System*; Miyoshi et al., 2004), faz uso do promotor *P<sub>xyIT</sub>* e dos elementos genéticos (sítio de ligação do ribossomo, RBS; e seqüência codificadora do peptídeo sinal, SP) da proteína *Usp45* de *L. lactis*, e foi utilizado com sucesso na linhagem NCDO2118 de *L. lactis*, demonstrando ser capaz de: (i) produzir, na presença de xilose, elevados níveis da proteína modelo Nuc (nuclease) de *Staphylococcus aureus*, comparáveis apenas aos níveis até hoje obtidos utilizando-se o sistema NICE; (ii) corretamente endereçar o produto final para o citoplasma ou meio extracelular; e (iii) diferentemente de todos os sistemas até hoje desenvolvidos, permitir “ligar ou desligar” a expressão gênica pela simples adição de xilose ou glicose, respectivamente. O sistema apresenta ainda certas vantagens em relação aos atuais sistemas de expressão, como por exemplo, ser de mais fácil manipulação, ser menos dispendioso e principalmente, ser mais seguro para uso humano e animal, visto que o mesmo é induzido por um açúcar.

Enfim, hoje, *L. lactis* se destaca como um microrganismo alternativo para a produção de moléculas de interesse biotecnológico, em relação ao uso de modelos como *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*. Inúmeras proteínas de origem eucariótica, bacteriana e viral já foram produzidas utilizando *L. lactis* como sistema de expressão (Nouaille et al., 2003; Le Loir et al., 2005).

#### *II.5.1.2. L. lactis como vacinas vivas de mucosa*

Iwaki e colaboradores em 1990 tentaram pela primeira utilizar *L. lactis* como vacinas vivas. Camundongos imunizados oralmente com essas linhagens expressando o antígeno PAc de *Streptococcus mutans* foram capazes de produzir tanto IgG quanto IgA PAc-específicos. Esses resultados mostraram que essa bactéria poderia ser utilizada como um carreador para apresentação e entrega de antígenos ao sistema imune. A partir de então, vários antígenos derivados de bactérias e vírus foram produzidos em *L. lactis* e a imunização com as linhagens recombinantes gerou efeitos profiláticos e terapêuticos em diversos modelos animais (Wells & Mercenier, 2008).

A maioria dos estudos sobre *L. lactis* como uma vacina viva foram feitos utilizando o TTFC (fragmento C da toxina tetânica), um antígeno altamente imunogênico. Norton e colaboradores (1995) observaram um aumento significativo nos níveis de IgA após a imunização oral dos camundongos com as linhagens recombinantes produtoras de TTFC. Outros trabalhos mostraram que os animais vacinados com *L. lactis* produtora da forma intracelular do antígeno desenvolveram altos níveis de IgG e IgA específicos para TTFC. Posteriormente, esses animais tornaram-se resistentes ao desafio com a toxina tetânica (Wells et al., 1993; Robinson et al., 1997).

Vários trabalhos confirmam a capacidade de *L. lactis* em apresentar antígenos para a mucosa, gerando resposta imunes específicas (Tabela 1) (Chatel et al., 2001). Resultados animadores foram obtidos após a imunização de animais com *L. lactis* produtoras da forma ancorada do antígeno E7 derivado do vírus HPV-16. Os animais vacinados apresentaram respostas imunes humoral e celular específica contra o antígeno (Bermúdez-Humarán et al., 2004). Em 2008 Sim e colaboradores imunizaram camundongos com linhagens de *L. lactis* produzindo o antígeno EDIII do vírus dengue tipo 2. O soro oriundo dos animais oralmente vacinados foi capaz de neutralizar *in vitro* esse vírus. Outro estudo bastante interessante utilizou *L. lactis* expressando a região do envelope protéico do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1). Ensaio de imunização oral com essas linhagens induziram altos níveis de IgG e IgA HIV-específicos além de respostas imunes mediada por células T (Xin et al., 2003).

A vacinação de camundongos com *L. lactis* expressando a proteína antigênica MrpA de *Proteus mirabilis* foi eficiente e os protegeu contra o desafio com *P. mirabilis* virulenta (Scavone et al., 2007). Vacinas de *L. lactis* expressando antígenos de outras bactérias corroboram a capacidade vacinal desse microrganismo. Camundongos intranasalmente imunizados com *L. lactis* produtor do antígeno PspA oriundo de *Streptococcus pneumoniae* foram mais protegidos contra o desafio com a linhagem virulenta quando comparados aos animais que receberam o adjuvante hidróxido de alumínio juntamente com PspA purificado. Esse resultado revela que *L. lactis* recombinante é capaz de combater doenças respiratórias infecciosas (Hanniffy et al., 2007). Daniel e colaboradores (2009) avaliaram o potencial de *L. lactis* secretando o antígeno LcrV de *Yersinia pseudotuberculosis* como uma vacina de mucosa contra a infecção por esse patógeno. Observou-se que as linhagens recombinantes induziram resposta imune humoral, sistêmica e celular nos animais e os protegeram contra infecção por *Y. pseudotuberculosis*.

Linhagens de *L. lactis* foram desenvolvidas para expressar citocinas visando o tratamento de doenças alérgicas e inflamatórias. Em 2006, o primeiro ensaio clínico utilizando *L. lactis* recombinante foi conduzido em pacientes com a Doença de Crohn. O

ensaio foi bem sucedido e demonstrou ser uma estratégia viável para o tratamento da doença em seres humanos (Braat et al., 2006).

**TABELA 1:** Respostas imunes detectadas após vacinação com linhagens de *L. lactis* recombinantes

| Patógeno                            | Veículo          | Antígeno                  | Modelo/Rota de administração                         | Proteção   |
|-------------------------------------|------------------|---------------------------|--|--|
| <i>Streptococcus pyogenes</i>       | <i>L. lactis</i> | Proteína M sorotipo 6 (A) | Camundongo/ intranasal                               | Sobrevivência dos animais aumentada após desafio |
| <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> | <i>L. lactis</i> | SpaA (A)                  | Camundongo/ intranasal                               | Animais protegidos                               |
| Rotavírus                           | <i>L. lactis</i> | VP7 (C/A/S)               | Camundongo/ intragástrica                            | Vírus neutralizado                               |
| Grupo B <i>Streptococcus</i>        | <i>L. lactis</i> | Pilus – ilha 1 (A)        | Camundongo/ subcutâneo, intraperitoneal e intranasal | Sobrevivência após desafio                       |
| <i>Brucella abortus</i>             | <i>L. lactis</i> | L7 ou L12 (C)             | Camundongo/ intragástrica                            | Proteção parcial após desafio                    |
| <i>Plasmodium yoelii</i>            | <i>L. lactis</i> | MSP1 (C)                  | Camundongo/ intragástrica                            | Redução da parasitemia                           |

A localização final da proteína está indicada: **S**: secretada; **C**: citoplasmática; **A**: ancorada (Adaptado de Wells & Mercenier, 2008).

# **III**

# **JUSTIFICATIVA**



Apesar de acompanhar a Humanidade há muitos séculos, a Tuberculose continua sendo motivo de preocupação até os dias de hoje. Há uma década a Organização Mundial de saúde (OMS) declarou a doença em estado de emergência no mundo por ser a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos, com exceção da AIDS. Segundo estimativas, dois bilhões de pessoas estão infectadas pelo *M. tuberculosis*, bactéria causadora da doença (Who, 2000).

O tratamento da TB está disponível desde 1944, quando foram descobertos os primeiros medicamentos capazes de eliminar o bacilo do organismo. Ele é feito com a administração de três ou mais drogas por no mínimo seis meses. Os pacientes geralmente desistem do tratamento ou o fazem de maneira inadequada, pois ele é muito longo com a associação de muitas drogas. Esses fatores favoreceram o surgimento de linhagens de micobactérias multi-drogas resistentes (MDR-TB) e, mais recentemente, extensivamente resistentes (XDR-TB), que são virtualmente intratáveis (Zhang, 2005; Lugo & Bewley, 2008).

A prevenção usual é a vacina BCG, aplicada nos primeiros 30 dias de vida. Essa vacina é capaz de proteger crianças contra as formas mais graves da doença, entretanto, ela não mostra atividade protetora em indivíduos adultos acometidos com a tuberculose pulmonar (Baumann et al., 2006). Demonstrou-se que o nível de proteção varia de 0 a 80% dependendo da população estudada (Britton, 2003). Além disso, o uso da BCG é restrito em pacientes imunocomprometidos, pois sendo uma vacina viva (composta por linhagens atenuadas de *M. bovis*), existe a possibilidade de a mesma ter a sua virulência revertida. Outro problema dessa vacina é que ela interfere com um importante teste diagnóstico para TB chamado de “teste da tuberculina”. Dessa maneira, estratégias para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes, mais seguras e economicamente viáveis são alvo de intensa investigação (Gupta et al., 2007; Foss & Murtaugh, 2000).

Vários grupos de pesquisa se voltaram para o desenvolvimento de uma nova vacina contra a TB utilizando diferentes antígenos que foram apresentados ao sistema imune de diversas maneiras. Atualmente, mais de 200 vacinas experimentais contra a tuberculose foram testadas utilizando-se diferentes modelos animais e algumas já estão em fase de ensaio clínico. Em 1999, pesquisadores da Universidade de São Paulo desenvolveram uma vacina de DNA baseada no antígeno Hsp65 de *M. leprae* que, quando administrada por via intramuscular, apresentava efeitos profiláticos e terapêuticos em camundongos posteriormente desafiados ou previamente infectados com *M. tuberculosis* virulenta, respectivamente (Silva et al., 1999). Entretanto, foi verificado que uma grande quantidade de DNA-*hsp65* era requerida para a estimulação do sistema imune (Souza et al., 2008). Além disso, por serem administradas por via parenteral, essa vacina se mostrou pouco eficiente em estimular o sistema imune associado às mucosas (Eriksson et al., 2002). Diante disso, e considerando que o primeiro contato de *M. tuberculosis* é estabelecido através da mucosa

nasal, sistemas de apresentação de antígenos diretamente à superfície de mucosas poderiam representar uma alternativa inovadora para o desenvolvimento de uma nova vacina contra a TB.

Nesse contexto, o nosso grupo de pesquisa vem preconizando a implementação de novas estratégias vacinais utilizando a bactéria láctica *L. lactis* como candidata ao desenvolvimento de novas vacinas de mucosa. A habilidade que *L. lactis* possui em apresentar antígenos heterólogos para o sistema imune e gerar respostas específicas já foi vastamente demonstrada (Wells & Mercenier, 2008). Além de conseguirem estimular o sistema imune, essas bactérias ainda não produzem endotoxinas ou qualquer outro produto metabólico tóxico (Bolotin et al., 2001) e são consideradas “GRAS” (Generally Recognized As Safe). Sendo assim, elas são muito interessantes para serem utilizadas como veículos vacinais.

O LGCM (Laboratório de Genética Celular e Molecular) tem demonstrado importância no cenário mundial no que se refere à utilização de *L. lactis* como um veículo vacinal. Alguns trabalhos publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram com sucesso a utilização desta bactéria como carreador para apresentação e entrega de antígenos ao sistema imune (Pontes et al., 2003; Miyoshi et al., 2006; Scavone et al., 2007).

Diante disso, linhagens de *L. lactis* produtoras da forma secretada e citoplasmática do antígeno Hsp65 de *M. leprae* foram desenvolvidas no LGCM. A construção dessas linhagens constituiu o primeiro passo para a implementação de uma nova estratégia vacinal não só contra a TB, mas também contra microrganismos filogeneticamente relacionados, como *M. leprae* e *M. bovis*. Os detalhes da construção das linhagens estão apresentados na dissertação de mestrado da aluna Clarissa Santos Rocha intitulada “Construção de linhagens recombinantes de *Lactococcus lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65 de *Mycobacterium leprae*: desenvolvimento tecnológico do processo de obtenção da proteína recombinante e suas implicações científicas”. Essa dissertação foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética ICB-UFMG e desenvolvida sob a orientação do Prof. Dr. Anderson Miyoshi e co-orientada pelo Prof. Dr. Vasco Azevedo.

Assim, o presente trabalho testou a imunogenicidade das linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras de rHsp65 por via de administração intranasal, vislumbrando o seu possível uso contra a tuberculose experimental, em colaboração com o Laboratório de Vacinas Gênicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, liderado pelo Prof. Dr. Célio Lopes da Silva, juntamente à empresa Farmacore Biotecnologia. Essas duas instituições vêm cada vez mais de preocupando e apoiando esforços para o desenvolvimento de uma nova vacina mais efetiva e economicamente viável contra a tuberculose.

# **IV**

# **OBJETIVOS**

#### IV. 1 Objetivos gerais

Caracterização e a avaliação da imunogenicidade conferida por linhagens de *Lactococcus lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65 de *M. leprae* após imunização intranasal de camundongos.

#### IV. 2 Objetivos específicos

- Analisar a produção do antígeno pelas linhagens recombinantes através da técnica de “Western Blot”.
- Determinar o teor de LPS das linhagens recombinantes através do teste de Lisado de Amebócito do *Limulus* (LAL).
- Imunizar intranasalmente camundongos BALB/c com as linhagens de *L. lactis* produtoras da forma secretada e citoplasmática do antígeno Hsp65 de *M. leprae*.
- Detectar os isotipos IgG1, IgG2a no soro e IgA anti-Hsp65 no lavado Bronco Alveolar (Lba) dos animais imunizados (resposta imune humoral).
- Determinar o perfil de citocinas do padrão Th1 (IL-12 e INF- $\gamma$ ) ou Th2 (IL-5 e IL-10) produzidas por células do linfonodo e baço dos animais 6 dias após a imunização.
- Determinar a presença da citocina IL-10 produzida no Lba dos animais 6 dias após a última imunização.

#### IV. 3 Objetivos finais associados ao projeto

- Avaliar a proteção induzida pela imunização com as linhagens de *L. lactis* recombinantes após o desafio com *M. tuberculosis* H37Rv através da recuperação de unidades formadoras de colônia e analisar histopatologicamente os pulmões, nos intervalos de 30 e 70 dias após a infecção.
- Validar o emprego de *L. lactis* enquanto um sistema para a produção de Hsp65 de *M. leprae* sem contaminação por LPS; o que permitirá a utilização clínica deste antígeno, com grau farmacêutico

- Utilizar este sistema para a produção de outras proteínas de interesse biotecnológico.
- Demanda de patente sobre as linhagens de *L. lactis* recombinantes enquanto um sistema vacinal.

**V**  
**MATERIAL E MÉTODOS**

## V. 1 Linhagens bacterianas e acondicionamento microbiológico

As linhagens bacterianas empregadas neste trabalho estão listadas na Tabela 2. O meio de cultivo utilizado para o crescimento de *L. lactis* foi o M17 (Difco) suplementado com 0,5% de glicose ou 1% de xilose (GM17 ou XM17, respectivamente). Quando necessário 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (Sigma) foi adicionado. Elas foram crescidas a 30°C sem agitação. Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico (Difco) foi adicionado aos meios supracitados. Para fins de estocagem, as linhagens de *L. lactis*, foram cultivadas em meio sólido por um período de 18 horas (“overnight”). Em seguida, colônias isoladas foram individualmente coletadas com o auxílio de uma alça bacteriológica descartável e inoculadas em meio líquido. Depois de cultivadas, as culturas foram diluídas (4:1) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em um ultrafreezer -80°C. Detalhes do preparo do meio de cultura e das soluções utilizadas seguem abaixo:

- Glicose (40% p/v): 40 g de Glicose (Merck) foram dissolvidas em uma quantidade suficiente para (q.s.p) 100 mL de água pura. A solução foi então passada em um filtro de 0,22 µm (Corning), aliquotada, e acondicionada, na geladeira, a 4°C. O processo de filtração se deu dentro de uma capela de fluxo laminar (Pachane).
- Xilose (25% p/v): 25 g de Xilose foram dissolvidas em q.s.p 100 mL de água pura. A solução foi então passada em um filtro de 0,22 µm (Corning), aliquotada, e acondicionada, em freezer, a - 20°C. O processo de filtração se deu dentro de uma capela de fluxo laminar (Pachane).
- Cloranfenicol (10 mg/mL): 100 mg de Cloranfenicol (Sigma) foram dissolvidos em álcool etílico PA (Merck) e a solução foi então passada em um filtro 0,22 µm (Corning). Alíquotas da solução de antibiótico foram estocadas, em freezer, a - 20°C. O processo de filtração se deu dentro de uma capela de fluxo laminar (Pachane).
- Glicerol (80%): 80 mL de glicerol (USB) foram dissolvidos em q.s.p 100 mL de água pura. Em seguida a solução foi autoclavada (120°C, 15 min.), aliquotada, e estocada, em geladeira, a 4°C.
- M17 líquido: 37.5 g de M17 foram pesados na balança analítica, e em seguida foram solubilizados em q.s.p 950 mL de água pura, obtida pelo processo de osmose reversa. A solução foi homogeneizada, com auxílio de um agitador magnético e o pH foi ajustado para 6.9. Posteriormente, o meio foi autoclavado durante 15 minutos a 120°C.
- M17 sólido: 15 g de ágar bacteriológico (Difco) foram diluídos em q.s.p 1L de água de osmose reversa. Posteriormente, o meio foi autoclavado durante 15 minutos a 120°C e distribuído em placas de petri.

- M17 + Glicose (GM17): Meio M17 acrescido de Glicose 0,5% estéril.
- M17 + Xilose (XM17): Meio M17 acrescido de Xilose 1% estéril.

**TABELA 2:** Linhagens bacterianas

| Espécie                                  | Linhagem   | Fonte       |
|--|--|-------------|
| <i>L. lactis</i> NCDO2118 <sup>a</sup>   | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>  | LGCM        |
| <i>L. lactis</i> pSEC:hsp65 <sup>b</sup> | <i>L. lactis</i> NCDO2118 portadora do vetor de expressão pXylT:SEC:hsp65/Cm <sup>r</sup> contendo a seqüência codificadora do peptídeo sinal da proteína <i>Usp45</i> (SP <sub>Usp</sub> ) de <i>L. lactis</i> fusionada à ORF <i>hsp65</i> de <i>M. leprae</i> sob o controle do promotor P <sub>xylT</sub> (Fig. 4)   | Rocha, 2007 |
| <i>L. lactis</i> pCYT:hsp65 <sup>c</sup> | <i>L. lactis</i> NCDO2118 portadora do vetor de expressão pXylT:CYT:hsp65/Cm <sup>r</sup> contendo o sítio de ligação do ribossomo (RBS) da seqüência codificadora da proteína <i>Usp45</i> de <i>L. lactis</i> fusionado à ORF <i>hsp65</i> de <i>M. leprae</i> , sob o controle do promotor P <sub>xylT</sub> (Fig. 4) | Rocha, 2007 |

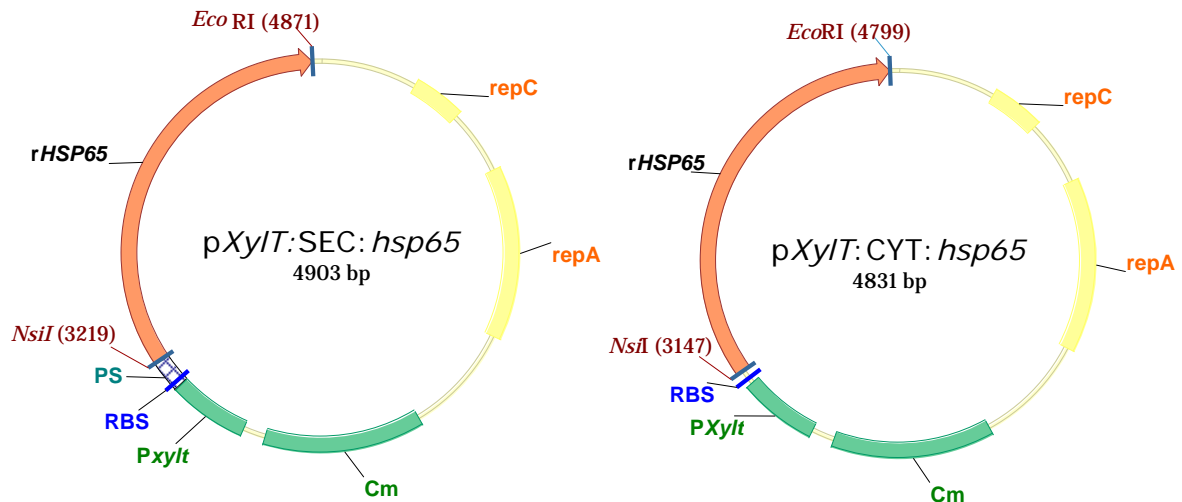
<sup>a</sup>: Linhagem selvagem de *L. lactis* pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

<sup>b</sup>: Linhagem recombinante de *L. lactis* portadora do plasmídeo pXylT:SEC:hsp65/Cm<sup>r</sup> desenvolvida por Rocha (2007).

<sup>c</sup>: Linhagem recombinante de *L. lactis* portadora do plasmídeo pXylT:CYT:hsp65/Cm<sup>r</sup> desenvolvida por Rocha (2007).

Cm<sup>r</sup>: Resistência ao antibiótico cloranfenicol.





**Figura 4: Representação dos vetores de expressão pXylIT:SEC:hsp65 e pXylIT:CYT:hsp65.** PxyIT: Promotor induzido por xilose. RBS: Sítio de ligação do ribossomo da seqüência codificadora da proteína Usp45 de *L. lactis*. PS: Peptídeo sinal da proteína Usp45. NsiI e EcoRI: Sítio para as enzimas de restrição NsiI e EcoRI. rHSP65: ORF hsp65 de *M. leprae*. repA e repC: origens de replicação. Cm: Gene que confere resistência ao cloranfenicol.

## V. 2 Indução da expressão gênica em *L. lactis*

### ▪ Primeiro dia

Colônias isoladas de *L. lactis* pSEC:hsp65, *L. lactis* pCYT:hsp65 e *L. lactis* selvagem foram individualmente inoculadas em 5 mL de meio GM17, onde apenas os meios de cultivo destinados às linhagens recombinantes foram suplementados com cloranfenicol na concentração de 10 µg/mL. Em seguida, os inóculos permaneceram em uma estufa a 30°C por 18 horas, sem agitação.

### ▪ Segundo dia

As culturas crescidas “overnight” foram diluídas (1:10.000) em 10 mL de GM17 (controle negativo da indução) e em 10 mL de XM17. Posteriormente, os inóculos foram incubados na estufa a 30°C, sem agitação, por mais 18 horas.

### ▪ Terceiro dia

Após as culturas terem alcançado uma densidade óptica (OD<sub>600nm</sub>) 2.0, 2 mL das culturas foram coletados e centrifugados (7 min., 4°C e 13.000 rpm). Após a centrifugação, o precipitado celular e 1,5 mL do sobrenadante foram coletados para posterior extração protéica das frações citoplasmática e secretada (processo descrito na próxima seção).

### V.3 Extração das frações protéicas citoplasmática e secretada das linhagens recombinantes de *L. lactis* NCDO2118

Como descrito anteriormente, após a centrifugação, o precipitado celular e 1,5 mL do sobrenadante foram coletados para a extração protéica das frações citoplasmática e secretada, individualmente. Posteriormente, eles foram tratados separadamente.

O sobrenadante foi filtrado através de um filtro 0,22 µm (Corning) e depositado em outro microtubo. Adicionou-se ao filtrado 100 µL de Ácido Tricloroacético (TCA) 100% (p/v) gelado, 10mM de ditioneitol (DTT) (USB) e Coquetel Inibidor de Protease (Sigma). Os microtubos foram incubados em gelo durante uma hora. Após este período, eles foram centrifugados por 20 minutos, a 4°C e 13000 rpm. O sobrenadante, gerado pela centrifugação, foi descartado e o precipitado protéico foi ressuspensão em ½ volume de NaOH 50 mM (USB).

Já o precipitado celular, gerado pela centrifugação das culturas induzidas e não induzidas (vide item V. 2) foi ressuspensão em 120 µL de uma solução de TES-Lisozima, Coquetel Inibidor de Protease (Sigma) e DTT (USB) 10 mM. Por conseguinte, os microtubos foram incubados por 30 minutos a 37°C. Após esse tempo, foi adicionado 60 µL SDS 20% à mistura. Ao final, os microtubos contendo as proteínas oriundas da fração celular e do sobrenadante foram estocados, a -20°C, para posterior análise. O preparo das soluções utilizadas nos processos se deu como descrito abaixo:

- TCA 100% (p/v): 100 g de TCA foram dissolvidos em q.s.p 100 mL de água pura, com o auxílio de um aparelho do tipo vórtex. A solução foi estocada a 4°C.
- DTT 1M: 1,553 g de DTT foram dissolvidos em q.s.p 10 mL de Acetato de sódio 0,01M. A solução foi estocada a -20°C.
- TES-Lisozima: Uma solução de Sacarose 20% (Merck), Tris 50 mM pH 7.5 (USB), EDTA 5 mM (USB) e Lisozima 10 mg/mL (Sigma) foi preparada dissolvendo os reagentes em q.s.p 50 mL de água pura e estocada a - 20°C.
- Coquetel inibidor de proteases: (Mistura de inibidores de proteases solúveis): 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), E-64, bestatina, leupeptina, aprotinina e EDTA. O reagente foi diluído em q.s.p 10 mL de água miliQ estéril e estocado a - 20°C.
- NaOH 1M: 40g de NaOH foram dissolvidos em q.s.p 1L de água pura. A solução foi acondicionada em um frasco escuro e estocada à temperatura ambiente.

#### V.4 Teste do Lisado do Amebócito do *Limulus* (LAL)

O teste do Lisado do Amebócito do *Limulus* (LAL) foi utilizado para a detecção da endotoxina (LPS) nas proteínas extraídas da fração citoplasmática e secretada de *L. lactis* selvagem e recombinante utilizando-se o Kit QCL-1000® (Lonza). Primeiramente, 50 µl das amostras protéicas foram misturadas com 50 µl do LAL fornecido pelo Kit e incubadas a 37°C por 10 minutos. Logo depois, foi adicionado ao LAL e às amostras 100 µl do substrato incolor (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA), também fornecido pelo Kit. A mistura foi mantida a 37°C durante 6 minutos. Por fim, a reação foi parada adicionando-se 100 µl do reagente de parada. A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 410 nm. Uma vez que a concentração de endotoxina é diretamente proporcional à absorbância, a quantidade de LPS presente nas amostras foi calculada a partir dos valores obtidos de uma curva padrão. O teste foi feito em quadruplicata. As amostras com valor < 0.1 EU/µg foram consideradas livres de endotoxina.

#### V. 5 Confirmação da expressão de rHsp65 produzida por *L. lactis*

##### V. 5. 1 QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA

O teor de proteína contida nos extratos celular e sobrenadante de *L. lactis* foi aferido pelo ensaio de Bradford (1976), usando um padrão de albumina sérica bovina (BSA). Para tanto, 200 µL do reagente de Bradford (BioAgency) foi acrescido a uma alíquota de 800 µL correspondente às amostras extraídas diluídas em água. A diluição das amostras foi preparada em triplicata da seguinte maneira: 20 µL da fração protéica extraída + 780 µL de água milliQ; 40 µL da fração extraída + 760 µL de água milliQ; 60 µL da fração extraída + 740 µL de água milliQ. Posteriormente, as reações foram incubadas a temperatura ambiente por cinco minutos e então foi medida a absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. Paralelamente foi feito uma curva padrão de BSA entre 0 e 10 µg/mL. A concentração de proteínas das amostras foi então determinada a partir de cálculos de regressão linear baseado nos valores obtidos a partir da curva padrão.

##### V. 5. 2 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As proteínas extraídas de *L. lactis* (item V. 3) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970). Uma quantidade de 3 a 5 µg de proteína foi utilizada para a realização das resoluções eletroforéticas, sendo a concentração do gel de “separação” 12%

e do gel de “concentração” 3%. A eletroforese foi conduzida com voltagem constante de 100 V em tampão Tris-glicina (Tris-HCl 25 mM – USB, glicina 192 mM - Merck). As especificações para a confecção dos géis seguem abaixo:

**TABELA 3:** Modo de preparo dos géis de “separação” e “concentração”

| Gel de “separação” 12%               |        | Gel de “concentração” 3% |           |
|--------------------------------------|--------|--------------------------|-----------|
| Água                                 | 3,4 mL | Água                     | 3,8 mL    |
| Acrilamida/Bis (BioAgency)           | 4,0 mL | Acrilamida/Bis           | 0,5 mL    |
| Tris-HCl – 1,5 M pH 8,8 (USB)        | 2,5 mL | Tris-HCl – 1M pH 6,8     | 0,6125 mL |
| SDS 10% (Merck)                      | 0,1 mL | SDS 10%                  | 50 ul     |
| Temed (BioAgency)                    | 5 ul   | Temed                    | 5 ul      |
| Persulfato de amônio 10% (BioAgency) | 50 ul  | Persulfato de amônio 10% | 50 ul     |

### V. 5. 3 “WESTERN BLOTTING”

Imediatamente após a corrida eletroforética (vide item V. 5. 2), o gel foi incubado por 15 minutos em uma placa contendo o tampão de transferência previamente preparado e gelado. Todos os acessórios incluindo a membrana, as esponjas e os papéis de filtro foram também incubados no tampão pelo mesmo tempo, separadamente. A transferência foi realizada por 1 hora e 30 minutos a 150 V. A seguir, a membrana foi mantida em solução bloqueio (PBS-tween/leite desnatado) por 1 hora. Posteriormente, o anticorpo anti-Hsp65 produzido em camundongo (vide item V. 7), diluído 1:2.500 em 10 mL da solução bloqueio, foi adicionado à membrana e a mesma foi incubada por mais 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação. Após essa incubação, foi adicionado 10 mL de solução bloqueio contendo 0,5 µL de anti-IgG acoplado à fosfatase alcalina (Sigma). A membrana foi depois mantida no escuro por mais uma hora. Em seguida, adicionou-se a ela 10 mL de tampão de revelação (contendo NBT e BCIP- Sigma). Após 10 minutos de incubação, a membrana foi finalmente lavada com água destilada e as bandas foram visualizadas. As soluções utilizadas estão detalhadas abaixo:

- Tampão de transferência: Tris-HCl 25 mM (USB), glicina 192 mM (Merck) e 20% metanol (Synth); pH 8,3.
- PBS 1X: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM (J.T. Baker); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 17 mM (J.T.Baker); NaCl 1,4 mM (Merck); KCl 27 mM (Synth).
- PBS-Tween: PBS 1X; tween 0, 05 % (Amersham Biosciences).
- Solução Bloqueio: Solução de leite desnatado 5% (Molico) em PBS-Tween 0,05%.

## V. 6 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c, SPF (*Specific Patogen Free*), fêmeas, com 3 a 6 semanas de idade, provenientes do Biotério de Animais Isogênicos da Universidade de Campinas (Unicamp). Os animais foram mantidos em isoladores de animais, com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlado, com livre acesso à água e ração.

## V. 7 Produção de anticorpos anti-Hsp65

Camundongos BALB/c foram imunizados subcutâneamente com 50 µg da proteína rHsp65 purificada de *Escherichia coli* misturada com adjuvante incompleto de Freud (Sigma) na proporção 1:1. Os animais receberam três doses dessa mistura a cada 15 dias (dias 15, 30 e 45). O soro foi coletado do plexo orbital por meio de uma pipeta paster de vidro no dia 0 e no dia 50. Finalizado o experimento, os animais foram sacrificados com sedação prévia seguida de deslocamento cervical. A proteína rHsp65 utilizada foi cedida gentilmente pela mestrandia Wendy Rios da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

## V. 8 Imunizações com as linhagens de *L. lactis* produtoras da forma secretada e citoplasmática do antígeno rHsp65 de *M. leprae*

### V. 8. 1 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS

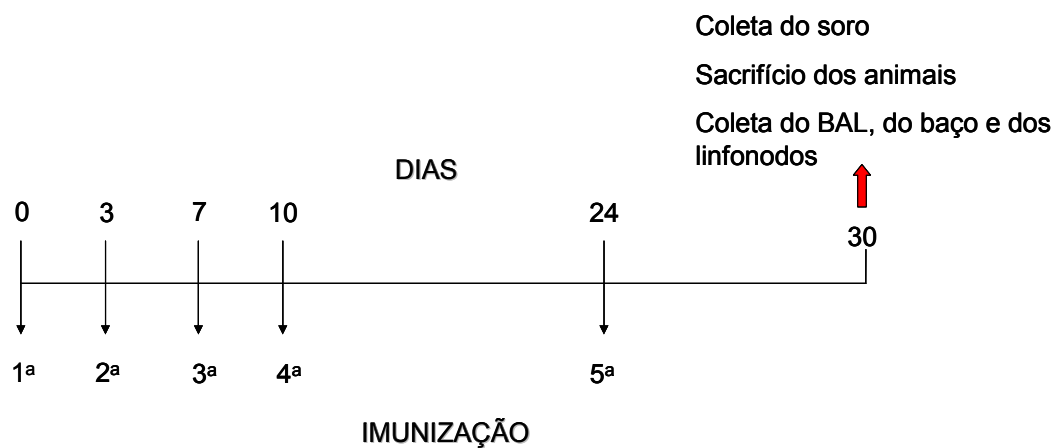
Após as culturas recombinantes de *L. lactis* induzidas e não induzidas (vide item V. 2) terem atingido a  $DO_{600nm}$  2.0, 1 mL das mesmas foram coletadas e centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm. O “pellet” gerado pela centrifugação foi ressuspensionado em 100 µL de PBS 1X estéril e os microtubos contendo esse material foram mantidos em gelo até o momento da imunização.

Foi estabelecido o número de unidades formadoras de colônia (UFC) antes da primeira imunização. Para isso, foram feitas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) a partir de 10 µL do homogeneizado. As diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  foram plaqueadas em meio M17 sólido e as placas mantidas, em estufa, a 30°C durante a noite. No dia seguinte, realizou-se a contagem das colônias e o cálculo para verificação da UFC.

## V. 8. 2 IMUNIZAÇÕES E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Camundongos BALB/c receberam intranasalmente, com o auxílio de uma pipeta,  $10^8$  UFC das linhagens recombinantes de *L. lactis*, em um volume de 10  $\mu$ L. A imunização se deu nos dias 0, 3, 7, 10 e 24. Foram formados cinco grupos, cada um contendo seis animais. Os grupos de camundongos foram inoculados da seguinte maneira:

- Grupo 1: PBS 1X estéril (Tampão Salina Fosfato 1X);
- Grupo 2: *L. lactis* produzindo a forma secretada do antígeno (*L. lactis* pSEC:hsp65), após a indução;
- Grupo 3: *L. lactis* produzindo a forma citoplasmática do antígeno (*L. lactis* pCYT:hsp65), após a indução;
- Grupo 4: *L. lactis* pSEC:hsp65 e *L. lactis* pCYT:hsp65 na proporção de 1:1, após a indução;
- Grupo 5: *L. lactis* pSEC:hsp65 e *L. lactis* pCYT:hsp65 na proporção de 1:1, sem indução;

ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO

Seis dias após a última imunização, o soro, o lavado bronco-alveolar (Lba), o baço, os linfonodos mediastinais, cervicais e axilares foram coletados para avaliação da resposta imune celular e humoral.

## V. 9 Caracterização do Perfil de Resposta Imunológica

### V. 9. 1 PROCESSAMENTO DO SORO E DO LBA PARA DOSAGEM DE ANTICORPOS

O sangue dos animais imunizados foi retirado da veia do plexo retro-orbital com o auxílio de pipetas Pasteur nos dias 0 e 30 antes do sacrifício e recolhido em microtubos. O material foi mantido por uma hora a temperatura ambiente e logo depois centrifugado a 3.500 rpm durante 15 minutos. O soro foi coletado e armazenado em uma placa de 96 poços a -20°C até a dosagem dos anticorpos.

O Lba foi coletado injetando-se 1 mL de salina no trato respiratório dos animais já eutanaziados. O material recolhido foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi depositado em placa de 48 poços. Posteriormente, as placas foram mantidas a -20°C até a dosagem de anticorpos.

### V. 9. 2 PROCESSAMENTO DO BAÇO E DO LINFONODO PARA CULTURA DE CÉLULAS

Os linfonodos cervicais, mediastinais e axilares foram coletados em tubos tipo "Falcon" de 15 mL contendo 2 mL de RPMI-Incompleto (Sigma). O baço foi coletado da mesma maneira. Os dois órgãos foram macerados e centrifugados a 4°C e 1.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante gerado pela centrifugação foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Gibco), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (10 mg/mL), gentamicina (100 µg/mL), L-glutamina (200 mM) (Gibco) e 2-mercaptoetanol ( $5 \cdot 10^{-5}$  M) (Sigma). Posteriormente, as células dos linfonodos e do baço foram contadas na câmara de Neubauer e diluídas para uma concentração final de  $5 \times 10^6$  células/mL na placa.

### V. 9. 3 CULTURA DE CÉLULAS PARA DOSAGEM DE CITOCINAS

Para dosagem das citocinas, 1 mL da suspensão do baço e do linfonodo obtida no item anterior foi distribuída em placas de 24 poços. Em seguida foram adicionados à placa dois estímulos: mitógeno concanavalina A (conA) (400 mg/mL) e rHsp65 (200 mg/mL). O meio RPMI foi também adicionado como controle negativo do experimento. A cultura foi incubada a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Após esse tempo, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 4°C e 1.500 rpm. 1 mL do sobrenadante gerado foi transferido para outra

placa e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem de citocinas por ELISA (vide item V. 9. 5. 1).

#### V. 9. 4 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

##### V. 9. 4. 1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos

A resposta imune humoral foi avaliada por ELISA através da produção de anticorpos específicos anti-Hsp65 nas amostras do soro e do Lba coletadas após a última imunização. No Lba avaliou-se a presença de IgA anti-Hsp65 e no soro os dois subtipos IgG1 e IgG2a anti-Hsp65. Primeiramente, placas de poliestireno foram sensibilizadas com  $5\ \mu\text{g/mL}$  de rHsp65 diluída em tampão de ligação. A placa foi vedada e incubada a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas. Após esse tempo, elas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem. As reações inespecíficas foram bloqueadas com tampão bloqueio e incubadas por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, a placa foi novamente lavada e as amostras, diluídas 2x, 10x, 100x e 1000x em solução de PBS 1X com de SBF(10%)/Tween 20 (0,05%), foram adicionadas. A placa foi novamente vedada e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Logo depois, acrescentou-se o anticorpo anti-IgA, anti-IgG1 ou anti-IgG2a conjugado à biotina (Sigma) e a placa foi novamente incubada por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após o procedimento de lavagem,  $100\ \mu\text{L/poço}$  da solução de avidina biotina peroxidase StrepAB kit<sup>TM</sup> (Dako) foi adicionada sendo incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. A revelação se deu pela adição da solução de OPD substrato Peroxidase (Sigma). A reação foi interrompida com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 16% (Merck) e a leitura se deu em espectrofotômetro a 490 nm ( $\text{DO}_{490}$ ) (mQuant Bio-Tek Instruments Inc.). Todos os anticorpos foram utilizados de acordo com as recomendações do fabricante. As soluções utilizadas estão especificadas abaixo:

- Tampão de ligação:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (J. T. Baker) a 0,1 M, pH 9,0.
- Tampão bloqueio: PBS 1X; 0,05% de Tween 20 (Amersham Biosciences); 5% soro bovino fetal (Gibco).
- Tampão de lavagem: PBS 1x e 0,05% de Tween 20 (Vetec).

#### V. 9. 5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

##### V. 9. 5. 1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas

A resposta imune celular foi avaliada no sobrenadante da cultura de células do linfonodo e do baço por ELISA seis dias após a última imunização. Em ambos os órgãos verificou-se a presença das citocinas IL-12 e  $\text{INF-}\gamma$  – específicos do padrão de resposta Th1



– e IL-5 e IL-10 específicos do padrão de resposta Th2. Para tanto, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura (purificado) específico para a citocina de interesse (PharMingen), diluído em tampão de ligação na concentração de 1µg/mL. Após incubação por 16 horas a 4°C, a placa foi lavada com tampão de lavagem e as reações inespecíficas foram bloqueadas com 200µL/poço de tampão bloqueio. Posteriormente, incubou-se a placa por 1 hora a temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens as amostras foram adicionadas juntamente com a curva padrão da citocina recombinante diluída em PBS/SBF 10%/Tween 20 a 0,05%, e incubadas por 16 h a 4°C. As placas foram novamente lavadas e o anticorpo anti a citocina de interesse conjugado à biotina (PharMingen) foi adicionado. Após o procedimento de lavagem, 100 µL/poço da solução de avidina biotina peroxidase StrepAB kit™ (Dako) foi adicionada sendo incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram reveladas pela adição da solução de OPD (Sigma) após novo procedimento de lavagem. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 16% (Merck). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm (mQuant Bio-Tek Instruments Inc.). Os detalhes das soluções utilizadas seguem abaixo:

- Tampão de ligação: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (J. T. Baker) a 0,1 M, pH 9,0.
- Tampão bloqueio: PBS 1X com 10% de soro bovino fetal (Gibco).
- Tampão de lavagem: PBS 1x e 0,05% de Tween 20 (Vetec).

#### V. 9. 6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados estão expressos como a média ( $\pm$ ) desvio padrão. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste One-Way ANOVA, seguido do teste “Bonferroni” ambos disponíveis no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Um valor de  $p < 0,05$  foi utilizado como limite da significância estatística.

#### V. 10 Aspectos bioéticos e de biossegurança

- (i) Bioética: Os procedimentos e as manipulações dos animais foram efetuados segundo as normas dos comitês de ética em pesquisa do ICB/UFMG e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).
- (ii) Biossegurança: As devidas precauções de biossegurança foram tomadas de acordo com normas e regulamentos de biossegurança estabelecidos no Centro de Pesquisas em Tuberculose (FMRP-USP), e na Empresa Farmacore

(SUPERA-USP/RP). Todo o material utilizado foi autoclavado e descartado seguindo as normas vigentes no país.

# VI

# RESULTADOS

## VI.1 Confirmação da expressão de rHsp65 produzida em *L. lactis*

### VI.1.1 “ENSAIO DE BRADFORD”

O LGCM, em um trabalho prévio, construiu linhagens de *L. lactis* capazes de produzir as formas citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65 de *M. leprae*. Experimentos de “Bradford” foram conduzidos visando à padronização da quantidade de proteínas a ser utilizada nos experimentos de imunodeteção.

Foi observado que 2 µg/µL da fração protéica total extraída apresentou-se como sendo a menor quantidade de proteína requerida para o aparecimento de sinais do antígeno Hsp65 em membrana de nitrocelulose, após ensaios de “Western Blotting” (dados não mostrados).

### VI.1.2 WESTERN BLOTTING

Experimentos de “Western Blotting” foram então conduzidos com o intuito de assegurar a capacidade produtiva das linhagens para a realização dos subseqüentes experimentos de imunização. Além disso, esse experimento permitiu a comparação entre quantidade do antígeno presente nas diferentes frações protéicas extraídas dos clones pCYT:*hsp65* e pSEC:*hsp65*.

Linhagens de *L. lactis* contendo o vetor pXyIT:CYT:*hsp65* ou pXyIT:SEC:*hsp65* foram induzidas com xilose para produção de rHsp65. Quando as culturas crescidas com esse açúcar atingiram a DO<sub>600nm</sub> de 2.0, alíquotas foram recolhidas e submetidas à extração protéica. O mesmo procedimento foi utilizado nas culturas crescidas com glicose, que serviram como controle negativo da indução.

A confirmação da capacidade de produção e correto endereçamento de rHsp65 produzida por *L. lactis* foi feita através de “Western Blot” seguido de imunodeteção utilizando anticorpo anti-Hsp65 produzido em camundongo. Para isso, as amostras protéicas extraídas foram analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante e transferidas para membranas de nitrocelulose para posterior imunodeteção.

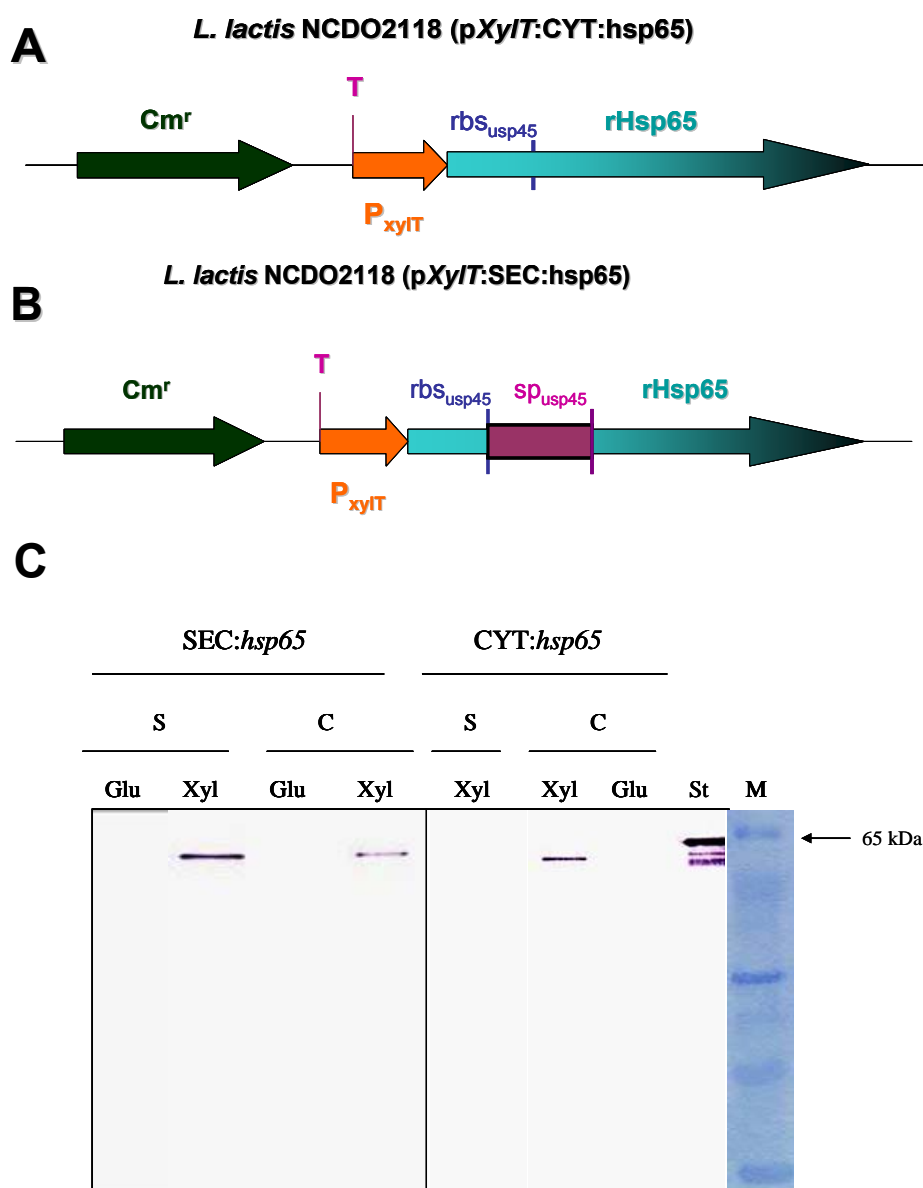
Os experimentos de imunodeteção confirmaram que *L. lactis* pCYT:*hsp65* e *L. lactis* pSEC:*hsp65* são capazes de produzir e corretamente endereçar a proteína rHsp65 de *M. leprae*, como mostrado na figura 5.

As culturas crescidas em glicose não foram capazes de produzir o antígeno rHsp65, porém, aquelas crescidas com o açúcar xilose foram capazes de sintetizá-lo como revelado nas canaletas *Glu* e *Xyl*, respectivamente. A rHsp65 produzida por *L. lactis* pCYT:*hsp65*

ficou retida dentro da célula, o que está de acordo com o esperado, já que o vetor de expressão pXylT:CYT não possui peptídeo sinal para a exportação da proteína.

O antígeno produzido pela linhagem *L. lactis* pSEC:hsp65 ficou tanto retido dentro da célula como foi secretado. Comparando-se o sinal de rHsp65 na fração celular (C) e secretada (S), pode-se perceber que a eficiência de secreção, ou seja, a razão entre a quantidade de proteína observada no meio extracelular e no conteúdo intracelular é de aproximadamente 60%.

Foi estimado que a linhagem *L. lactis* pSEC:hsp65 secreta cerca de 7 mg/L do antígeno comparando-o com o padrão utilizado.



**Figura 5: Imunodeteção da rHsp65 a partir de culturas das linhagens *L. lactis* pSEC:hsp65 e *L. lactis* pCYT:hsp65. (A) e (B) Representação esquemática do vetor de expressão XIES para a produção de rHsp65 intracelular e secretada, respectivamente. P<sub>xylT</sub>: Promotor induzido por xilose. rbs<sub>Usp45</sub>: Sítio de ligação do ribossomo da sequência**

codificadora da proteína Usp45 de *L. lactis*. **sp<sub>Usp45</sub>**: Peptídeo sinal da proteína Usp45. **rHsp65**: ORF *hsp65* de *M. leprae*. **Cm<sup>f</sup>**: Gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol. **(C) cyt:hsp65**: *L. lactis* produtora da forma intracelular da rHsp65. **sec:hsp65**: *L. lactis* produtora da forma secretada da rHsp65. **S**: Fração secretada. **C**: Fração citoplasmática. **M**: Padrão de peso molecular “low weight” Jena Bioscience. **St**: Proteína rHsp65 purificada produzida em *E. coli* (0,158 µg/µl). **Glu**: Linhagens crescidas em glicose, não induzidas. **Xyl**: Linhagens crescidas em xilose, induzidas.

### VI.1.3 TESTE DO LISADO DO AMEBOCITO *LIMULUS* (LAL)

O teste de LAL foi realizado a partir das frações protéicas extraídas de *L. lactis* recombinante e selvagem para a investigação do grau farmacêutico das linhagens a serem utilizadas nos ensaios imunológicos. Este teste constitui um dos métodos mais sensíveis de detecção de endotoxinas (ou lipopolissacarídeos – LPS) bacterianas presentes em produtos biológicos. O LPS é capaz de gerar várias respostas inflamatórias, causando distúrbios neuropsiquiátricos e choque séptico em animais (Feng et al., 2008). Dessa maneira, a constatação da ausência de impurezas contaminantes nas linhagens garante sua qualidade, segurança e eficácia. A tabela 4 demonstra os resultados obtidos.

**TABELA 4:** Resultados do ensaio do Lisado do Amebócito do *Limulus* realizado a partir das frações protéicas extraídas das linhagens recombinantes de *L. lactis*

| Linhagens                        | Limite de UE/µg aceito | Resultados            |       |
|----------------------------------|------------------------|-----------------------|-------|
|                                  |                        | Media de UE/µg obtida | Final |
| <i>L. lactis</i> pCYT:hsp65 C I  | < 0,1                  | 0,00881               | A     |
| <i>L. lactis</i> pCYT:hsp65 C NI | < 0,1                  | 0,00501               | A     |
| <i>L. lactis</i> pCYT:hsp65 S I  | < 0,1                  | 0,00458               | A     |
| <i>L. lactis</i> pCYT:hsp65 S NI | < 0,1                  | 0,00641               | A     |
| <i>L. lactis</i> pSEC:hsp65 C I  | < 0,1                  | 0,00192               | A     |
| <i>L. lactis</i> pSEC:hsp65 C NI | < 0,1                  | 0,00542               | A     |
| <i>L. lactis</i> pSEC:hsp65 S I  | < 0,1                  | 0,00137               | A     |
| <i>L. lactis</i> pSEC:hsp65 S NI | < 0,1                  | 0,00205               | A     |
| <i>L. lactis</i> selvagem C      | < 0,1                  | 0,01119               | A     |
| <i>L. lactis</i> selvagem S      | < 0,1                  | 0,00225               | A     |

**A:** Aprovado; **C:** Fração celular; **S:** Fração secretada; **I:** Linhagem Induzida; **NI:** Linhagem Não Induzida; **UE/µg:** unidades endotóxicas/micrograma *L. lactis* **pCYT:hsp65:** Linhagem produtora da forma citoplasmática do antígeno; *L. lactis* **pSEC:hsp65:** Linhagem produtora da forma secretada do antígeno

Todas as amostras testadas apresentaram concentração de endotoxina abaixo de 0,1 UE/µg e, dessa maneira, foram consideradas livres de LPS cumprindo os requisitos estabelecidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*), USP (*United States Pharmacopeia*) e EP (*European Pharmacopoeia*). Considerando que *L. lactis* é uma bactéria Gram-positiva

e que o LPS esta presente somente na parede celular de bactérias Gram-negativas, os resultados observados estão de acordo com o esperado.

## VI. 2 Caracterização do Perfil de Resposta Imunológica

Camundongos BALB/c foram imunizados com as linhagens recombinantes de *L. lactis* para verificação do padrão de citocinas e anticorpos produzidos após as imunizações. Antes dos ensaios de proteção, e de extrema importância verificar se a formulação vacinal desenvolvida e capaz de estimular as células T antígeno-específicas bem como a produção de anticorpos por células B. O perfil de resposta imunológica do tipo Th1, que se caracteriza principalmente pela produção da citocina IL-12 por macrófagos e INF- $\gamma$  por células T auxiliares, e o desejado para se combater o *M. tuberculosis* (Wangoo et al., 2001). A produção de INF- $\gamma$  por células T induz a produção de anticorpos do subtipo IgG2a pelos linfócitos B. Os anticorpos auxiliam na proteção, embora a resposta imune celular seja considerada indispensável para o combate do bacilo (Hoft, 2008). Os resultados obtidos nos experimentos de imunogenicidade estão detalhados nas seções subseqüentes.

### VI. 2. 1 ENSAIOS DE IMUNOGENICIDADE

Camundongos BALB/c receberam intranasalmente cinco doses de  $10^8$  UFC de *L. lactis* produzindo a forma citoplasmática [*L. Lactis* (pCYT:hsp65)] e secretada [*L. lactis* (pSEC:hsp65)] do antígeno rHsp65 nos dias 0, 3, 7, 10 e 24. Seis dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e avaliados em relação a diversos parâmetros como: produção de anticorpos IgG1, IgG2a e IgA anti-Hsp65 e produção das citocinas INF- $\gamma$ , IL-12, IL-5 e IL-10. Os grupos testados nos ensaios que se seguiram foram:

- a. grupo controle negativo vacinado com PBS 1X;
- b. grupo controle negativo vacinado com as linhagens *L. lactis* (pCYT:hsp65) e *L. lactis* pSEC:hsp65 na proporção 1:1 não induzidas;
- c. grupo teste vacinado com a linhagem *L. lactis* pCYT:hsp65 induzida;
- d. grupo teste vacinado com a linhagem *L. lactis* pSEC:hsp65 induzida;
- e. grupo teste vacinado com as linhagens *L. lactis* pCYT:hsp65 e *L. lactis* pSEC:hsp65 na proporção 1:1 induzidas.

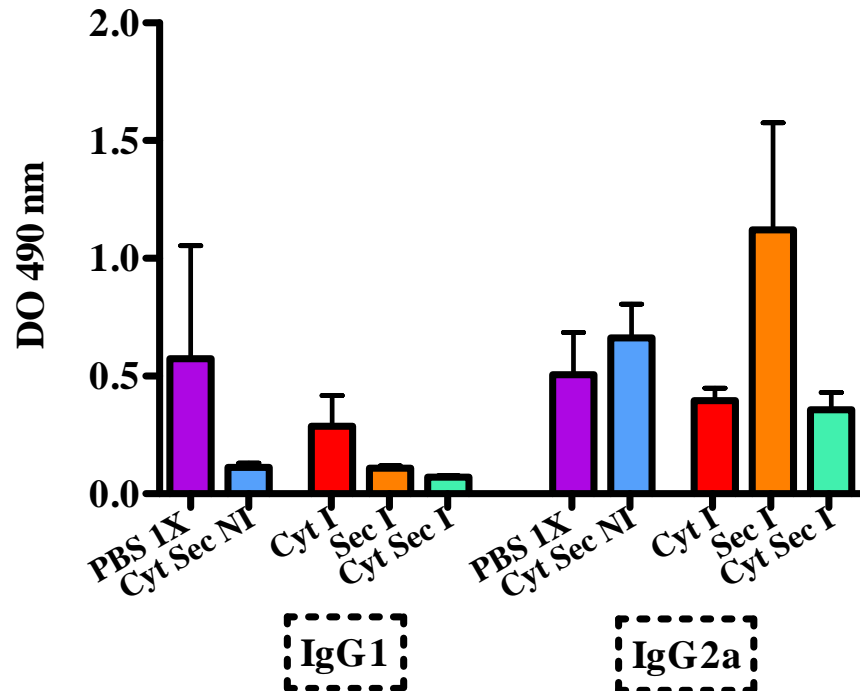
### VI. 2. 2 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE HUMORAL

VI. 2. 2. 1 *Imunoglobulinas IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 detectadas no soro dos animais imunizados*

As amostras de soro obtidas pós-imunização foram diluídas 2x, 10x, 100x e 1000x para verificar qual a diluição mais adequada para a detecção das imunoglobulinas em espectrofotômetro. Determinou-se que a diluição ideal para representar a produção de anticorpos específicos produzidos a partir das imunizações foi a de 2x.

A resposta imune humoral no soro dos animais vacinados foi avaliada através da detecção de anticorpos do subtipo IgG1 e IgG2a anti-Hsp65, por meio da técnica de ELISA. Os camundongos imunizados exibiram baixa produção dos anticorpos testados. Além disso, a produção de IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 pelos animais imunizados com as linhagens produtoras de rHsp65 foi estatisticamente insignificante em relação aos grupos controle, os quais receberam PBS 1X e as linhagens de *L. lactis* não induzidas ( $P > 0.05$ ) (Fig. 6).

Comparando-se os níveis de anticorpos de ambas subclasses, observou-se o predomínio do subtipo IgG2a (razão IgG2a:IgG1  $> 1$ ), o que sugere a predominância de resposta do tipo Th1. Entretanto, como os resultados não são significantes, não se pode concluir se a maior quantidade desse anticorpo se deve à vacinação com as linhagens.



**Figura 6: Anticorpos dos subtipos IgG1 e IgG2a específicos para rHsp65 detectados em amostras de soro dos animais imunizados intranasalmente com *L. lactis* recombinante.** As amostras foram coletadas seis dias após a imunização com culturas de *L. lactis* induzidas (I) ou não induzidas (NI). (Cyt) *L. lactis* pCYT:hsp65; (Sec) *L. lactis* pSEC:hsp65; (Cyt Sec) *L. lactis* pCYT:hsp65 e *L. lactis* pSEC:hsp65 (1:1); (PBS 1X)



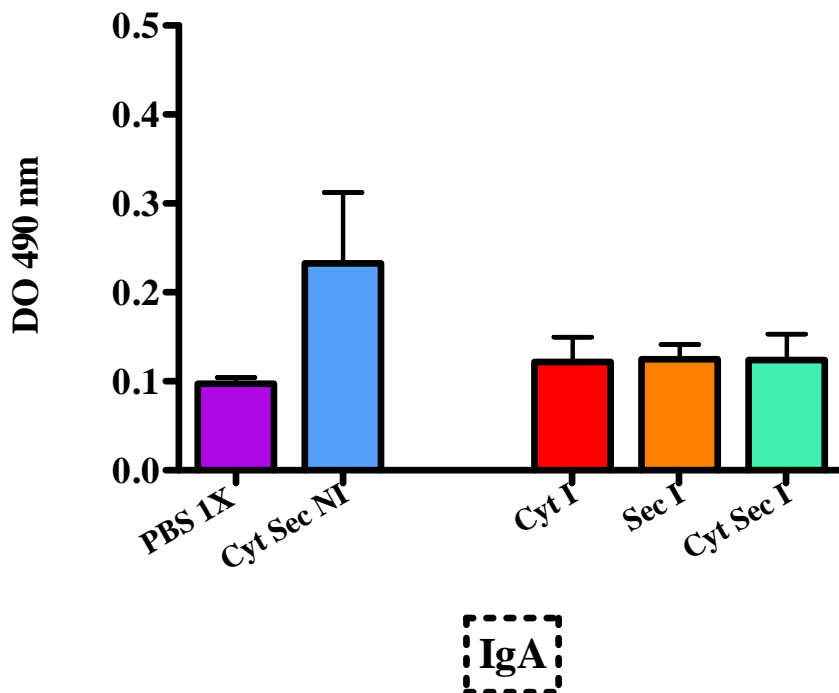
Tampão Salina Fosfato. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

A partir desses resultados pode-se verificar que a imunização com as linhagens recombinantes induzidas não induziram produção de anticorpos IgG1, IgG2a específicos para Hsp65 de *M. leprae*.

#### VI. 2. 2. 2 Imunoglobulina IgA anti-Hsp65 detectada no Lavado Bronco Alveolar (Lba) dos animais imunizados

Para verificar se as linhagens recombinantes, induzidas ou não, de *L. lactis* NCDO2118 produtoras de rHsp65 foram capazes de estimular a produção de anticorpos IgA anti-Hsp65, amostras do Lba dos animais vacinados não diluídas foram avaliadas através da técnica de ELISA para a detecção dessa imunoglobulina.

A produção de IgA anti-Hsp65 pelos animais imunizados foi baixa e, além disso, não foi estatisticamente significativa em relação aos grupos controle, como mostrado na figura 7.



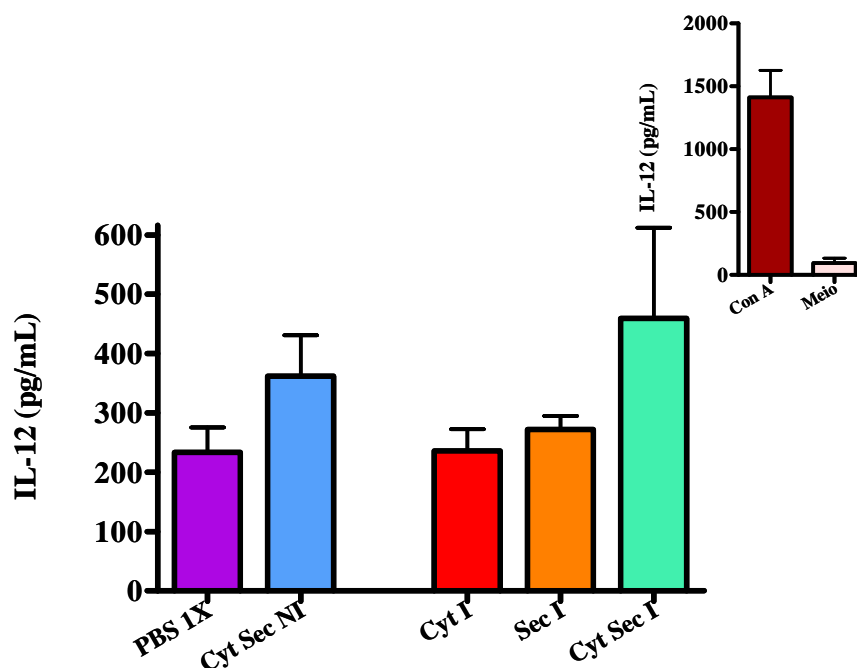
**Figura 7: Anticorpos IgA específicos para rHsp65 detectados em amostras do Lba dos animais imunizados intranasalmente com as linhagens recombinantes de *L. lactis*.** As amostras foram coletadas seis dias após a imunização com culturas de *L. lactis* induzidas (I) ou não induzidas (NI). (Cyt) *L. lactis* pCYT:hsp65; (Sec) *L. lactis* pSEC:hsp65; (Cyt & Sec) *L. lactis* pCYT:hsp65 e *L. lactis* pSEC:hsp65 (1:1); (PBS 1X) Tampão Salina Fosfato. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

## VI. 2. 3 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE CELULAR

VI. 2. 3. 1 Avaliação da produção das citocinas INF- $\gamma$ , IL-12, IL-5 e IL-10 nos linfonodos derivados dos animais vacinados com as linhagens recombinantes de *L. lactis*

Para avaliar qual perfil de resposta imune celular estava sendo induzido após a vacinação com as linhagens recombinantes de *L. lactis*, as citocinas INF- $\gamma$  e IL-12, consideradas marcadores da resposta imune do tipo Th1, e as citocinas IL-5 e IL-10, consideradas, por sua vez, marcadores da resposta imune do tipo Th2, foram escolhidas para serem mensuradas. Sendo assim, a resposta imune celular foi avaliada a partir de ensaios de ELISA utilizando o sobrenadante das culturas de linfonodos dos camundongos imunizados.

Quando os níveis de IL-12 detectados nos grupos vacinados foram comparados aos dos grupos controle, foi verificado que não houve produção significativa dessa citocina (Fig. 8).



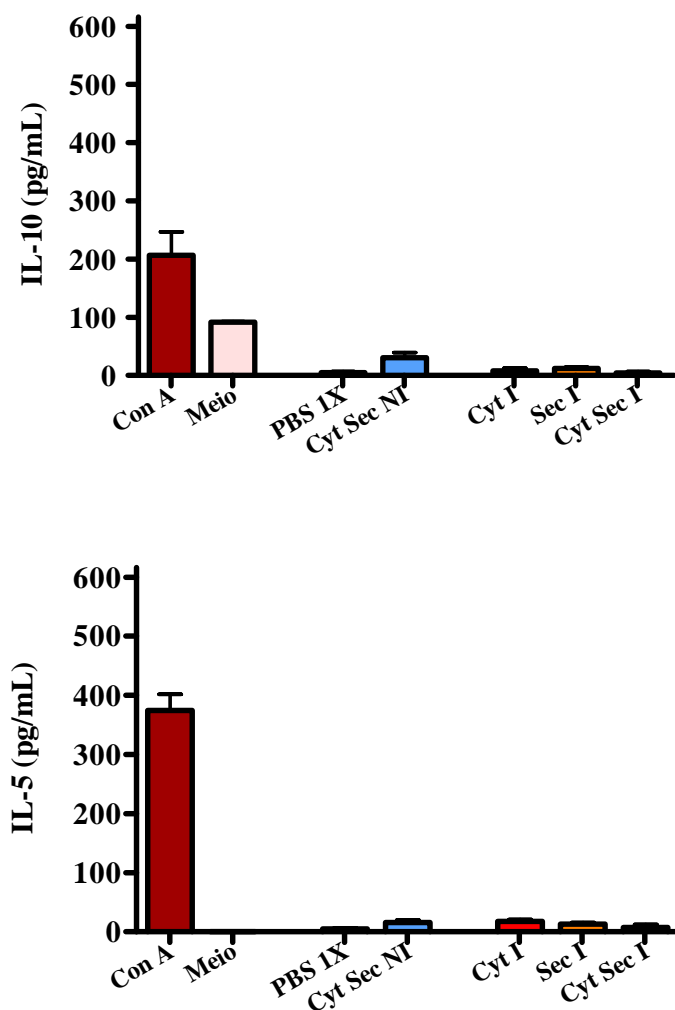
**Figura 8: Indução da produção de IL-12 pelas células do linfonodo dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *L. lactis*.** Resultados, em pg/mL, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de seis animais imunizados. A leitura foi realizada a 450nm. Grupos controle: PBS 1X e Cyt & Sec NI. Grupos testes: Cyt I, Sec I e Cyt & Sec I. Controle positivo do experimento: Mitógeno de concanavalina A (Con A). Controle negativo do experimento: Meio RPMI. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

Os ensaios para a detecção de INF- $\gamma$  resultaram negativos, sugerindo que o nível de produção dessa citocina ficou abaixo do limite de detecção da técnica (dados não mostrados).

A figura 9 mostra a produção de IL-10 e IL-5 nos linfonodos dos animais imunizados. Essa produção foi considerada basal, pois os níveis detectados dessas citocinas foram muito baixos e não significativos em relação aos níveis produzidos pelos controles (Fig. 9).

Comparando com todas as citocinas testadas, os níveis obtidos para IL-12 foram os mais altos. No entanto, não se pode fazer nenhuma correlação entre os grupos vacinados e a quantidade de IL-12 uma vez que não foi observada uma produção significativa dessa citocina nos grupos vacinados com as culturas recombinantes induzidas.

Esses resultados demonstram que as linhagens de *L. lactis* pCYT:hsp65 e *L. lactis* pSEC:hsp65 não foram capazes de induzir resposta imune celular nos linfonodos dos animais testados.

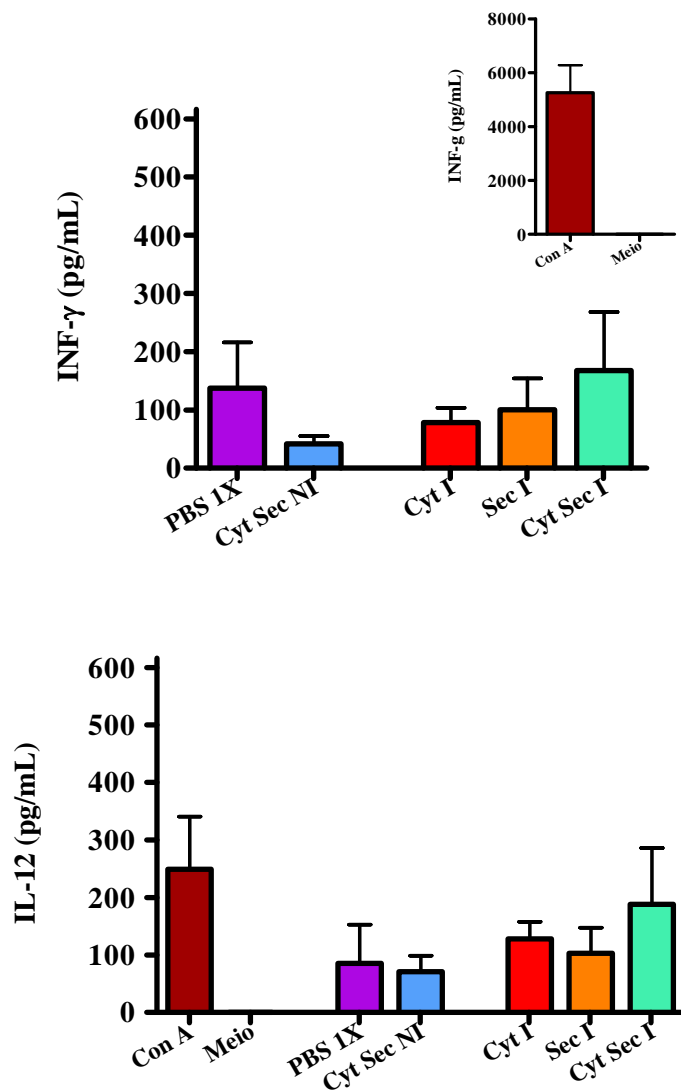


**Figura 9: Indução da produção de IL-10 e IL-5 pelas células do linfonodo dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *L. lactis*.** Resultados, em pg/ml, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de seis animais imunizados. A

leitura foi realizada a 450nm. Grupos controle: PBS 1X e Cyt & Sec NI. Grupos testes: Cyt I, Sec I e Cyt & Sec I. Controle positivo do experimento: Mitógeno de concanavalina A (Con A). Controle negativo do experimento: Meio RPMI. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

VI. 2. 3. 2 Avaliação da produção das citocinas INF- $\gamma$ , IL-12, IL-5 e IL-10 nos esplenócitos derivados dos animais vacinados com as linhagens recombinantes de *L. lactis*

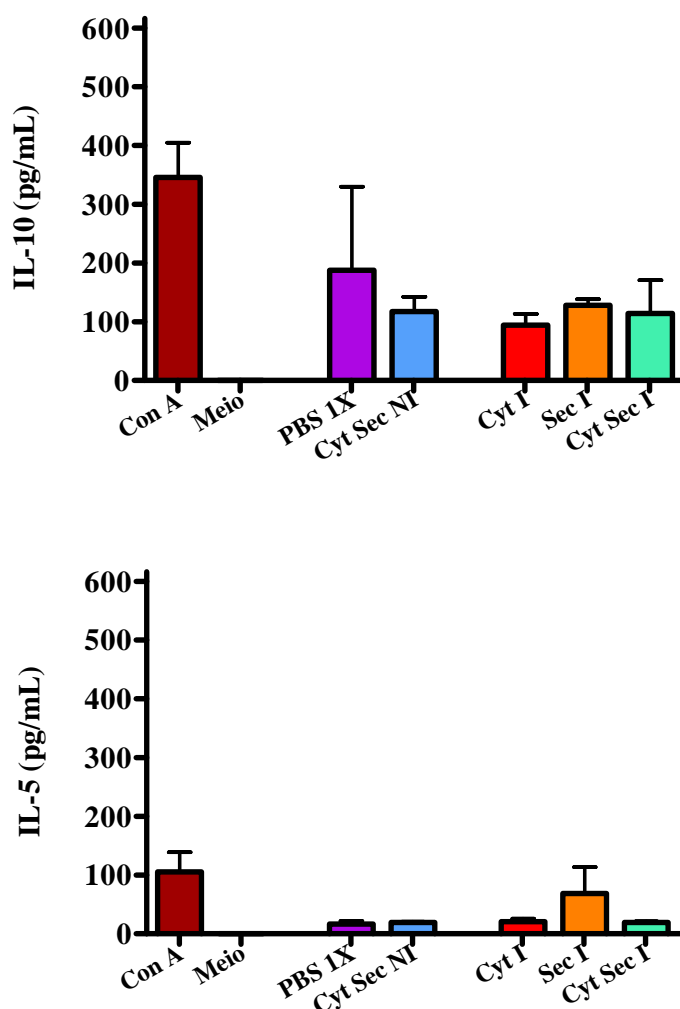
A produção das citocinas INF- $\gamma$ , IL-12, IL-5 e IL-10 foram avaliadas por ELISA no sobrenadante das culturas de esplenócitos dos camundongos imunizados com o intuito de se determinar o padrão de resposta imune, Th1 ou Th2, gerado. A Figura 10 mostra os resultados obtidos no ensaio de ELISA para as citocinas do padrão Th1 INF- $\gamma$  e IL-12.



**Figura 10: Indução da produção de INF- $\gamma$  e IL-12 pelos esplenócitos dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *L. lactis*.** Resultados, em pg/ml, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de seis animais imunizados. A leitura foi realizada a 450nm. Grupos controle: PBS 1X e Cyt & Sec NI. Grupos testes: Cyt I, Sec I e Cyt & Sec I. Controle positivo do experimento: Mitógeno de concanavalina A (Con A). Controle negativo do experimento: Meio RPMI. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

Os resultados observados nas figuras acima revelam que não houve nenhuma produção significativa das citocinas do padrão Th1 (INF- $\gamma$  e IL-12) avaliadas nos esplenócitos dos animais vacinados.

A figura 11 ilustra os resultados obtidos para as citocinas IL-10 e IL-5 também avaliadas nos esplenócitos dos animais imunizados.



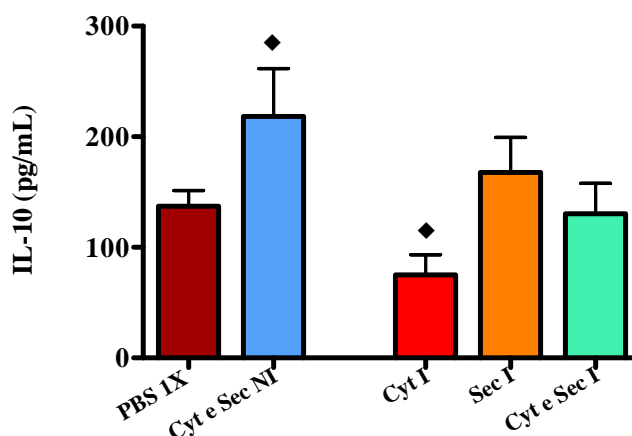
**Figura 11: Indução da produção de IL-10 e IL-5 pelos esplenócitos dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *L. lactis*.** Resultados, em pg/ml, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de seis animais imunizados. A leitura foi realizada a 450nm. Grupos controle: PBS 1X e Cyt & Sec NI. Grupos testes: Cyt I, Sec I e Cyt & Sec I. Controle positivo do experimento: Mitógeno de concanavalina A (Con A). Controle negativo do experimento: Meio RPMI. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

Novamente, os resultados obtidos para IL-10 e IL-5 foram similares aos obtidos para as demais citocinas testadas. Os níveis detectados foram baixos e não significativos em relação aos níveis produzidos pelos grupos controles.

Esses resultados demonstram que as linhagens de *L. lactis* pCYT:hsp65 e *L. lactis* pSEC:hsp65 não foram capazes de induzir resposta imune celular no baço dos animais imunizados com as mesmas.

### VI. 2. 3. 3 Avaliação da produção da citocina IL-10 no Lavado Bronco Alveolar (Lba) dos animais vacinados com as linhagens recombinantes de *L. lactis*

A linhagem *L. lactis* NZ9000 administrada oralmente em camundongos estimulou a produção de IL-10 no Lba dos animais (Villena et al., 2008). Para verificar se a linhagem utilizada nesse trabalho, *L. lactis* NCDO21118, seria capaz de gerar esse mesmo efeito, o Lba dos camundongos imunizados com *L. Lactis* pCYT:hsp65 e *L. lactis* pSEC:hsp65 foi recolhido e avaliado quanto à produção da citocina IL-10. A figura 12 ilustra os resultados obtidos.



**Figura 12: Indução da produção de IL-10 no Lba dos animais imunizados com as linhagens recombinantes de *L. lactis*.** Resultados, em pg/ml, são representados como a média e desvio padrão de cada grupo de seis animais imunizados. A leitura foi realizada a 450nm. Grupos controle: PBS 1X e Cyt & Sec NI. Grupos testes: Cyt I, Sec I e Cyt & Sec I. Controle positivo do experimento: Mitógeno de concanavalina A (Con A). Controle negativo do experimento: Meio RPMI. Foi considerado com diferença estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

Foi observado um aumento significativo da citocina IL-10 no Lba dos animais vacinados com *L. lactis* pCYT:hsp65 e *L. lactis* pSEC:hsp65 (1:1) não induzidas, em relação ao Lba dos animais que receberam a linhagem *L. lactis* pCYT:hsp65 induzida. Provavelmente, a presença do antígeno rHsp65 modulou o sistema imune de maneira a diminuir a quantidade de IL-10 no organismo dos animais.

# VII

# DISCUSSÃO

O uso de *L. lactis* como uma usina para a produção de moléculas de interesse médico e biotecnológico para sua aplicação como um veículo vacinal é bastante promissor uma vez que essas bactérias são consideradas seguras apresentando o status “GRAS”. Além disso, vários estudos já demonstraram a capacidade que *L. lactis* possui em gerar respostas imunes sistêmicas e/ou de mucosas contra antígenos heterólogos sintetizados em seus compartimentos celulares (Bermúdez-Humarán et al., 2007; Wells & Mercenier, 2008). Somando isso à necessidade de se desenvolver uma nova vacina contra a TB já que a BCG, única vacina disponível, vem apresentando eficácia controversa, o desenvolvimento de linhagens de *L. lactis* expressando o antígeno rHsp65 de *M. leprae* poderiam representar uma nova alternativa para ser testada contra a TB (Rocha, 2007; Souza et al., 2008).

Dessa maneira nosso grupo de pesquisa desenvolveu linhagens de *L. lactis* NCDO2118 produtoras do antígeno rHsp65 de *M. leprae* baseado no sistema de expressão induzido por xilose (XIES – *Xylose Inducible Expressing System*) (Miyoshi et al., 2004; Rocha, 2007). O antígeno rHsp65 foi escolhido uma vez que sua utilização em ensaios de imunização induziu efeitos profiláticos e terapêuticos em vários modelos animais (Silva et al., 1994). Além disso, estudos pré-clínicos com Hsp65 tem mostrado o seu potencial como uma vacina contra TB (Lowrie et al., 1999; Silva, 1999; Bonato et al., 2004; Hoft, 2008). Por conseguinte, o interesse de se utilizar o sistema XIES foi baseado em certas vantagens que este apresenta em relação aos atuais sistemas de expressão como (i) ser de mais fácil manipulação, (ii) ser menos dispendioso, (iii) ser seguro para uso humano pelo fato de ser induzido por um açúcar (Miyoshi et al., 2004). Além disso, foi demonstrado que o XIES é capaz de produzir e endereçar corretamente proteínas para o meio intra e extracelular (Miyoshi et al., 2004).

As análises de imunodeteção revelaram que a proteína rHsp65 foi expressa sem sinal aparente de degradação, assim como observado por Rocha (2007). Grande quantidade das proteínas heterólogas produzidas em *L. lactis* são degradadas pela maior protease extracelular, HtrA, durante a sua translocação pela membrana celular (Poquet et al., 2000; Miyoshi et al., 2002). A falta de degradação da rHsp65 pela HtrA pode ser explicada pela composição altamente conservada dessa proteína (Silva, 1999). Dessa maneira, por ser muito conservada, a rHsp65 pode não estar sendo reconhecida por *L. lactis* como uma proteína exógena. Segundo Le Loir e colaboradores (2005) poucos trabalhos reportaram a produção de proteínas heterólogas em diferentes compartimentos celulares (ancorada à membrana ou produzida nos meios intra e extracelular) quando utilizados as mesmas condições de indução e o mesmo promotor.

O presente trabalho confirmou a habilidade do sistema XIES em produzir eficientemente rHsp65 nos meios intra e extracelular, da mesma maneira como verificado por Rocha (2007). Proteínas recombinantes produzidas por bactérias Gram-positivas, como



*L. lactis*, não são contaminadas por LPS (Lipopolissacarídeo), endotoxina capaz de induzir respostas imunológicas inespecíficas nos hospedeiros (Stewart and Young, 2004). Dessa maneira, a utilização biotecnológica das linhagens permitirá a obtenção do antígeno livre de LPS para uso clínico.

As linhagens recombinantes de *L. lactis* foram posteriormente utilizadas para investigar qual tipo de resposta imune celular era gerada (Th1 ou Th2) após os ensaios de imunogenicidade. O interesse foi o de encontrar um aumento significativo de células e imunoglobulinas do padrão Th1 de resposta nos camundongos vacinados, as quais são responsáveis por induzir atividades microbidas nos células infectadas auxiliando na eliminação do bacilo (Berrington & Hawn, 2007; Hoft, 2008).

O INF- $\gamma$  é uma citocina responsável pela ativação de mecanismos microbidas nos macrófagos infectados com a micobactéria. A indução dessa citocina sugere a ativação de uma resposta imune com padrão Th1 de resposta, necessária para o combate do bacilo (Boehm et al., 1997). Sob a sua influência, linfócitos B secretam IgG2a (Kaplan et al., 2001). Já a IL-12, produzida pelos macrófagos ativados diferencia as células T CD4+ que estão no sítio da infecção em efetores do tipo Th1, sendo assim, está também relacionada com o esse padrão de resposta (Salgame, 2005). A citocina IL-5 está envolvida principalmente com a eliminação de helmintos do hospedeiro e sua produção sugere ativação de uma resposta imune do tipo Th2, apesar da citocina IL-4 ser a considerada característica deste tipo de resposta e induzir a formação de anticorpos IgG1 (Kaplan et al., 2001; Hoft, 2008). A IL-10, por sua vez, apresenta importante propriedade antiinflamatória e supressora da resposta Th1. A presença desta citocina indica a regulação negativa da atividade de células T, sendo considerada então típica do padrão Th2 de resposta (Lu et al., 2003). Por essas características, as citocinas citadas acima foram escolhidas para serem utilizadas como “marcadores” para a verificação do padrão de resposta induzido após as vacinações.

Apesar da resposta imune celular mediada por células T ser considerada indispensável para o combate do bacilo dentro do hospedeiro, os anticorpos produzidos por linfócitos B também contribuem para a proteção, embora em menor escala, já que *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular (Hoft, 2008). Dessa maneira, é interessante que uma vacina anti-TB induza a formação de imunoglobulinas que têm a função de degradar os poucos bacilos que se encontram no meio extracelular (Hoft, 2008).

Diante dos resultados aqui apresentados, pode-se afirmar que a vacinação com as linhagens de *L. lactis* recombinantes não foi bem sucedida, pois não induziu um aumento significativo de anticorpos IgG1, IgG2a e IgA anti-hsp65 em camundongos vacinados. A presença de anticorpos específicos, embora em pequena quantidade, para o rHsp65 nos grupos controle pode ser explicada pela alta similaridade desse antígeno com o Hsp65 de

outras micobactérias ambientais que previamente poderiam ter sensibilizado os animais (Lindquist, 1986).

Além da imunização não ter sido efetiva para a formação de imunoglobulinas, ela também não induziu nenhum padrão de resposta (Th1 ou Th2), já que os níveis das citocinas INF- $\gamma$ , IL-12, IL-10, IL-5 avaliadas nos linfonodos e no baço dos animais mostraram-se não significativas em relação aos níveis obtidos para os grupos controle. Sendo assim, as linhagens demonstraram ser inefetivas em gerar resposta imune celular nesses dois órgãos. Esse resultado para as citocinas medidas em amostras do baço é esperado, pois a imunização efetuada nos camundongos se deu pela mucosa nasal. Em geral, a vacinação na mucosa gera respostas imunes nos linfonodos e não no baço, órgão que é geralmente estimulado após imunizações intramusculares (Hoft, 2008).

A falta de resposta imune humoral e celular observada pode ser devida a algumas características que *L. lactis* possui, como, por exemplo, não ser capaz de colonizar a cavidade oral e intestinal dos animais (Carr et al., 2002; Bermúdez-Humarán et al., 2004). Dessa maneira, o contato entre as bactérias contendo o antígeno rHsp65 e as células do sistema imune foi insuficiente para gerar uma resposta imune de grande magnitude. De acordo com Dieye e colaboradores (2003) a ausência de resposta imune observada em seu trabalho pode ser explicada pelo fato de as proteínas VP2 e VP3 do vírus IBDV produzidas por *L. lactis* terem ficado “presas” no peptidoglicano da parede celular da bactéria, impedindo, assim, o seu contato com as células do sistema imune.

A quantidade de rHsp65 produzida pelas linhagens pode também ter influenciado na resposta imune. Lee e colaboradores (2001) perceberam que a quantidade do antígeno UreB de *Helicobacter pylori* produzido por *L. lactis* não foi o fator limitante para a falta de resposta imune observada, sendo esta relacionada à tolerância imunológica ao antígeno que fora expresso. De acordo com isso, e considerando que a quantidade de rHsp65 obtida nesse trabalho foi similar à quantidade de UreB obtida no trabalho mencionado acima, a ausência de resposta imune pode não ter sido devida à quantidade de rHsp65 produzida pelas linhagens.

Para verificar se a dose de sua vacina poderia interferir na resposta imune, Zhang e colaboradores (2005) imunizaram oralmente camundongos com uma baixa dose ( $1 \times 10^8$  UFC) de *L. lactis* expressando o antígeno MSP-1<sub>19</sub> e com uma alta dose ( $5 \times 10^9$  UFC) dessa mesma preparação. Observou-se que o grupo que recebeu a baixa dose foi mais fortemente protegido do que o grupo imunizado com alta dose dessa bactéria, após o desafio com *Plasmodium yoelii*. Isso demonstra que altas doses da vacina não foram requeridas para proteção contra o patógeno. Na verdade existe um equilíbrio na dose a ser administrada para que a ativação da imunidade ocorra. É sabido que doses muito baixas da vacina podem tornar os linfócitos T auxiliares específicos não-responsivos (anérgicos) sendo

incapazes de sofrer ativação pelo antígeno. Por outro lado, doses muito altas e repetidas do antígeno podem induzir células T auxiliares específicas a sofrer apoptose (Abbas, 2005). Por isso, é importante padronizar o protocolo de imunização (número de doses, dias de administração) permitindo com que a dose administrada nos animais seja moderada para que uma resposta imune eficiente seja gerada (Zhang et al., 2005; Cortez-Perez et al., 2007). Contudo, para verificar se as doses das vacinas de *L. lactis* administradas nesse trabalho foram adequadas, outros experimentos utilizando diferentes protocolos de imunização deverão ser realizados no futuro.

De acordo com Wells & Mercenier (2008) outro importante fator que influencia na imunogenicidade de um antígeno é a sua localização celular (ancorado à membrana, intra ou extracelular). Quando linhagens de *L. lactis* produtoras do antígeno TTFC foram utilizadas como uma vacina, percebeu-se que o antígeno que estava ancorado à membrana de *L. lactis* foi mais imunogênico que aquele produzido intracelularmente por essa bactéria (Reveneau et al., 2002). Talvez, a localização intracelular da proteína rHsp65 não foi ideal para a geração de uma resposta imune perceptível.

Segundo Souza e colaboradores (2008), a utilização do antígeno rHsp65 foi promissora quando o mesmo foi utilizado como uma vacina de DNA. O presente trabalho demonstra uma nova maneira do rHsp65 ser apresentado ao sistema imune, ou seja, em sua forma protéica e sendo carregado por *L. lactis*. Talvez, esse modo de apresentação pode ter influenciado negativamente as suas propriedades imunoestimulantes.

Muitas questões acerca do uso das BL como veículos vacinais ainda não foram estabelecidas tal como a linhagem ideal para ser utilizada em ensaios de imunização para a geração de uma resposta imune protetora (Wells & Mercenier, 2008). A linhagem *L. lactis* NCDO2118, utilizada nesse trabalho, nunca foi testada como veículo vacinal e suas habilidades imunomodulatórias são desconhecidas. Poucos estudos são conduzidos com o intuito de avaliar as capacidades imunomoduladoras e citotóxicas de diferentes linhagens de *L. lactis*. Recentemente Suzuki e colaboradores (2008) testaram a habilidade de 46 linhagens de *L. lactis* em induzir a produção de IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ , sendo essas duas últimas citocinas interessantes para o combate de *M. tuberculosis*. No entanto, a capacidade de produção dessas citocinas não foi relacionada à subespécie ou à fonte do isolado. Quando o conhecimento nessa área for ampliado será possível selecionar as linhagens que são adequadas para ensaios de imunização (Wells & Mercenier, 2008).

Foi demonstrado que *L. lactis* produzindo a forma citoplasmática do rHsp65 reduziu significativamente a quantidade de IL-10 no lavado bronco alveolar dos animais imunizados com essa linhagem. Aparentemente, a presença do antígeno rHsp65 modulou o sistema imune de maneira a reduzir a quantidade dessa citocina no organismo. Esse efeito é interessante na medida em que a citocina IL-10, sendo característica do padrão de resposta

Th2, aumenta a susceptibilidade ao *M. tuberculosis* (Hoft, 2008). Sendo assim, a sua diminuição poderia proporcionar resistência ao bacilo. Entretanto, não é possível afirmar se de fato a presença de rHsp65 reduziu a quantidade de IL-10 uma vez que esse efeito não foi observado nos grupos vacinados com *L. lactis* pSEC:hsp65 induzido e com *L. lactis* pSEC:hsp65 & *L. lactis* pCYT:hsp65, ambas as linhagens induzidas (1:1).

Embora as vacinas de *L. lactis* produtoras de rHsp65 testadas nesse trabalho não tenham induzido nenhuma resposta imune aparente, isso não significa que elas não poderiam gerar proteção contra o desafio com a linhagem de *M. tuberculosis* virulenta. A imunização oral de camundongos com *L. lactis* expressando o antígeno MSP-1<sub>19</sub> de *Plasmodium yoelii* não gerou nenhuma resposta imune aparente. No entanto, após desafio com *P. yoelii*, os camundongos vacinados com as linhagens tiveram redução significativa da parasitemia quando comparados aos camundongos não vacinados (Zhang et al., 2005). Todavia, animais vacinados com as linhagens de *L. lactis* produtoras de rHsp65 deverão ser desafiados com *M. tuberculosis* H37Rv no futuro para a avaliação da proteção conferida por elas.

Considerando todos os resultados, não foi possível utilizar as linhagens recombinantes de *L. lactis* como vacinas contra *M. tuberculosis*. Consecutivamente, nosso grupo de pesquisa irá realizar outros experimentos visando à padronização da resposta imunológica contra *L. lactis* produtoras do antígeno rHsp65. Alguns fatores estão sendo investigados, tais como a possibilidade de se utilizar uma outra linhagem com propriedades adjuvantes, a localização celular do antígeno bem como a modificação do esquema de imunização.

# VIII

# CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### VIII.1 Conclusões

Os resultados apresentados no presente estudo permitem chegar às seguintes conclusões:

1. *L. lactis* confirmou-se uma excelente alternativa para a produção heteróloga de rHsp65 uma vez que as linhagens demonstraram-se capazes de produzir e corretamente endereçar a proteína recombinante;
2. *L. lactis* não foi capaz de induzir significativamente a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 no soro e IgA anti-Hsp65 no lavado bronco alveolar (Lba);
3. Não foi possível definir o padrão de resposta imune celular (Th1 ou Th2) induzido nos linfonodos e no baço dos animais vacinados uma vez que os ensaios de detecção das citocinas não revelaram a indução de quaisquer das citocinas mensuradas;
4. Aparentemente, a presença do antígeno rHsp65 foi capaz de modular o sistema imune de maneira a reduzir a quantidade da citocina IL-10 avaliada no Lba dos animais imunizados com a linhagem *L. lactis* pCYT:hsp65 induzida. Contudo, análises mais acuradas deverão ser consideradas para verificar esse efeito já que o mesmo não foi observado nos outros grupos testes.

### VIII.2 Perspectivas

A utilização de linhagens de *L. lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65 de *M. leprae*, um antígeno imunodominante capaz de induzir respostas imunes humoral e celular contra *M. tuberculosis*, permitiu o desenvolvimento tecnológico do processo de obtenção da proteína recombinante livre de LPS. A obtenção do rHsp65 foi sempre obtida a partir de bactérias Gram-negativas como a *Escherichia coli*, e, portanto, sempre contaminado com o LPS presente em sua membrana. O LPS é capaz de ativar o sistema imune de forma inespecífica (Stewart & Young, 2004), afetando o cérebro de animais e causando desordens neuropsiquiátricas como depressão, esquizofrenia e autismo (Feng et al., 2008). Sendo assim, a purificação do antígeno rHsp65 livre dessa endotoxina é essencial para que este seja utilizado de maneira segura como uma vacina.

Os resultados mostrados neste trabalho revelaram que as linhagens não foram capazes de eliciar respostas imunes humoral e celular nos camundongos vacinados. Sendo assim, as análises não foram suficientes para esclarecer o tipo de resposta imune celular gerado após imunização com as linhagens recombinantes de *L. lactis*. O trabalho, portanto, abre perspectivas para:

1. Realização de novos ensaios de imunização em camundongos com modificações nos cronogramas de imunizações, na linhagem de *L. lactis* a ser utilizada e na localização celular do antígeno rHsp65, que deverá estar ancorado à membrana celular da bactéria para uma melhor interação com as células do sistema imune;
2. Se confirmados os resultados esperados de imunogenicidade, os camundongos deverão ser desafiados com a linhagem virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv em laboratório nível de biossegurança P3 para verificação da proteção conferida após as vacinações;
3. Além disso, outras estratégias utilizando *L. lactis* como um veículo vacinal serão testadas, como, por exemplo, a utilização de linhagens de *L. lactis* produzindo internalinas de *Listeria monocytogenes* capazes de invadir células epiteliais não fagocíticas, permitindo a entrega de plasmídeos contendo o antígeno rHsp65 e favorecendo sua interação com células do sistema imune.

# **IX**

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



**Abbas, A. K.** *Imunologia Celular e Molecular*, 5º edição

**Bahjat KS, Schoenberger SP.** (2004). APCs size up antigens. *Nat Med*.10(7):679-81

**Baumann, S.; Eddine, A.N.; Kaufmann, S.H.E.** (2006). Progress in tuberculosis vaccine development. *Science*. 18:438-448

**Behr, M.A.** (2001). Correlation between BCG genomics and protective efficacy. *Tuberculosis.*, 81(1/2):165–8

**Bermúdez-Humarán, L. G., Nouaille, S., Zilberfarb, V., Corthier, G., Gruss, A., Langella, P., Issad, T.** (2007). Effects of Intranasal Administration of a Leptin-Secreting *Lactococcus lactis* Recombinant on Food Intake, Body Weight, and Immune Response of Mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5300-5307

**Bermúdez-Humarán, L.G.; Corthier, G.; Langella, P. R.** (2004) Recent advances in the use of *Lactococcus lactis* as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines. *Recent Res. Devel. Microbiology.* 8:147-160

**Berrington, W.R. & Hawn, T.R.** (2007). *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunological Reviews.* 219: 167–186

**Boehm, U.; Klamp, T.; Groot, M.; Howard, J.C.** (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 15:749-95

**Bolotin, A.; Wincker, P.; Mauger, S.; Jaillon, O.; Malarne, K.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S. D.; Sorokin, A.** (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11: 731-753

**Bonato, V.L.; Gonçalves, E.D.; Soares, E.G.; Santos J.R.R.; Sartori, A.; Coelho-Castelo, A.A.; Silva, C.L.** (2004). Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. *Immunology.* 113(1):130-8

**Bonato, V.L.; Lima, V.M.; Tascon, R.E.; Lowrie, D.B.; Silva, C.L.** (1998). Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun.* 66(1):169-75

- Braat, H., P. Rottiers, D. W. Hommes, N. Huyghebaert, E. Remaut, J. P. Remon, S. J. van Deventer, S. Neiryck, M. P. Peppelenbosch, Steidler, L.** (2006). A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4:754-9
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254
- Brahmbhatt, H.N.; Lindberg, A.A.; Timmis, K.N.** (1992). Shigella lipopolysaccharide: structure, genetics, and vaccine development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 180:45-64
- Brewer, T.F.** (2000). Preventing tuberculosis with Bacillus Calmette Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis.* 31:64–7
- Britton, J.W. & Palendira, U.** (2003). Improving vaccines against tuberculosis. *Immunology and cell Biology.* 50:34-35
- Campos, R. & Piantra, C.** (2001). Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul – Brasil. *Bol. da Saúde.* 15:61-71
- Caron, E. & Hall, A.** (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science.* 282:1717-1721
- Carr, F.J., Chill, D. and Maida N.** (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol.* 28:281-370
- Chammas, M.C.; Lundberg, J.S.; Juliano, A.G.; Salto, O.C.; Marcelino, A.S.Z.; Cerri, G.G.** (2004). Linfonodos cervicais: um dilemma para o ultra-sonografista. *Radiol. Bras.* 37(5):357-364
- Changhong, S.; Hai, Z.; Limei, W.; Jiase, A.; Li, X.; Tingfen, Z.; Zhikai, X.;Yong, Z.** (2009). Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of *Mycobacterium tuberculosis* and the human interleukin 2 fusion gene. *Tuberculosis.* 89:54-61

**Chatel J.M. ; Langella, P. ; Adel-Patient, K. ; Commissaire, J. ; Wal, J.M. ; Corthier, G.** (2001). Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8(3):545-51

**Chopin, A.; Chopin, M.C.; Moillo-Batt, A.; Langella, P.** (1984). Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid.* 11: 260:263

**Cooper, A.M.; Dalton, D.K.; Stewart, T.A.; Griffin, J.P.; Russell, D.G.; Orme, I.M.** (1993). Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med.* 178(6):2243-7

**Cortes-Perez, N.G.; Lefevre, F.; Corthier, G.; Patient, K, A.; Langella, P. ; Bermúdez-Humarán, L.G.** (2007). Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Science.* 25:6581-65-88

**Cosma, C.L., Sherman, D.R., Ramakrishnan, L.** (2003). The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:641-676

**Curtiss, R.; Kelly, S.M.; Tinge, S.A.; Tacket, C.O.; Levine, M.M.; Srinivasan, J.; Koopman, M.** (1994). Recombinant Salmonella vectors in vaccine development. *Dev. Biol. Stand.* 82:23-33

**Daniel, C. ; Sebbane, F. ; Poiret, S. ; Goudercourt, D. ; Dewulf, J. ; Mullet, C. ; Simonet, M. ; Pot, B.** (2009). Protection against *Yersinia pseudotuberculosis* infection conferred by a *Lactococcus lactis* mucosal delivery vector secreting LcrV. *Vaccine.* 27:1141–1144

**Dannenber, A.M.** (1989). Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infect Dis.* 2:S369-78

**De Ruyter, P. G.; Kuipers, O. P. ; De Vos, W. M.** (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.;* 62: 3662-3667

**De Ruyter, P.G.; Kuipers, O.P. ; De Vos, W.M.** (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3662-3667

- De Vos, W. M. & Gasson, M. J.** (1989). Structure and expression of the *Lactococcus lactis* gene for phospho-beta-galactosidase (*lacG*) in *Escherichia coli* and *L. lactis*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1833-1846
- De Vos, W.M. & Simons, G.F.M.** (1994). Gene cloning and expression systems in lactococci. In: M. J. Gasson and W. M. de Vos (Ed.). Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. *Chapman & Hill, Glasgow.* 52-105
- Dietrich, G.; Aagaard, C.; Leah, R.; Olsen, A.W.; Stryhn, A.; Doherty, T.M.** (2005). Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Tg85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficiency. *J Immunol.* 174(10):6332–9
- Dieye, Y.; Hoekman, A.J.W.; Clier, F.; Juillard, V.; Boot, H.J.; Piard, J.C.** (2003). Ability of *Lactococcus lactis* to Export Viral Antigens: a crucial Step for Development of Live Vaccines. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7281-7288
- Dieye, Y.; Usai, S.; Clier, F.; Gruss, A.; Piard, J.C.** (2001) Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 183:4157-4166
- Dorella, F.A.; Pacheco, L.G.C.; Oliveira, S.C; Miyoshi, A.; Azevedo, V.** (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence, *Vet. Res.* 37:201–218
- Duwat, P.; Cesselin, B.; Sourice, S.; Gruss, A.** (2000) *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 83-86
- Eden, V.; Zee, W.V.D.; Prakken, B.** (2005). Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nature Immunology.*5:318-330
- Eriksson, K. & Holmgren, J.** (2002). Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr Opin Immunol.* 14(5):666-72
- Eriksson, K., Quiding-Jarbrink, M.; Osek, J.; Moller, A.; Bjork, S.; Holmgren, J.; Czerkinsky, C.** (1998). Specific-antibody-secreting cells in the rectums and genital tracts of nonhuman primates following vaccination. *Infect Immun.* 66:5889-96
- Evans, J.T.; Ward, J.R.; Kern, J.; Johnson, M.E.** (2004). A single vaccination with protein-microspheres elicits a strong CD8T cell mediated immune response against *Mycobacterium*

*tuberculosis* antigens Mtb 8.4. *Vaccine*. 22:1964–72

**Fairbairn, I.P.** (2004). Macrophage apoptosis in host immunity to mycobacterial infections. *Biochem Soc Trans*. 32:496-498

**Flynn, J.L.** (2004). Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis*. 84:93-01

**Flynn, J.L.; Chan, J.** (2005) What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol*. 13:98-102

**Frieden, T.R. & Driver, C.R.** (2003) Tuberculosis control: past 10 years and future progress. *Tuberculosis (Edinb)*.83:82-5

**Gasson, M.J.** (1983). Genetic transfer systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 49(3):275-82

**Ginsberg, A.M.** (2002). What's new in tuberculosis vaccines? *Bull World Health Organ*. 80(6):483-488

**Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D.** (2002). Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis*. 8(8):843-9

**Gonzalo-Asensio, J.; Mostowy, S.; Harders-Westerveen, J.; Huygen, K.; Hernández-Pando, R.; Thole, J.; Behr, M.; Gicquel, B.; Martín, C.** (2008). PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *PLoS ONE*. 3(10):e3496

**Grange, J.M.** (1990). Tuberculosis. In: Smith GR, Easmon CSF, eds. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 8th ed. Vol. 3—Bacterial Diseases. Philadelphia: BC Decker, p 55

**Grode, L., Seiler, P., Baumann, S., Hess, J., Brinkmann, V., Edinne, A., Mann, P., Goosmann, C., Bandermann, S., Smith, D., Bancroft, G.J., Reyrat, J.M., Van Soolingen, D., Raupach, B., Kaufmann, S.H.** (2005). Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest*. 115:2472-2479

**Gullo, C. A.; Teoh, G.** (2004). Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunology letters*. 94:1-10

- Gupta, U.D.; Katoch, V.M.; McMurray, D.N.** (2007). Current status of TB vaccines. *Vaccine.*; 25(19):3742-51
- Gurski, J. & Baker, K.C.** (2008). An unusual presentation: renal tuberculosis. *Scientific World Journal.* 23;8:1254-5
- Gurunathan, S.; Wu, C.Y.; Freidag, B.L.; Seder, R.A.** (2000). DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol.* 12(4):442-7
- Ha, S.J.; Jeon, B.Y.; Kim, S.C.; Kim, D.J.; Song, M.K.; Sung, Y.C.** (2003). Therapeutic effect of DNA vaccines combined with chemotherapy in a latent infection model after aerosol infection of mice with *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene ther.* 10(18): 1592-9
- Hanniffy, S.B.; Carter, A.T.; Hitchin, E.; Wells, J.M.** (2007). Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. *J Infect Dis.* 195(2):185-93
- Hijjar, M.A.; Gerhardt, G.; Teixeira, G.M.; Procópio, M.J.** (2007). Retrospect of tuberculosis control in Brazil. *Rev Saúde Pública.* 41:1-9
- Hobson, P.; Barn, C.; Barnes, A.; Klavinskisa, L.S.** (2003). Mucosal immunization with DNA vaccines. *Science.* 31:217–224
- Hoft, D.** (2008). Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet.* 372:164-75
- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A. Staley, J.T.; Williams, S.T.** (1994) Bergey's manual of systematic bacteriology. *Williams and Wilkins.* 31:754-760
- Hopkins, S.; Kraehenbuhl, J-P.; Schodel, F.; Potts, A.; Peterson, D.; De Grandi, P.; Nardelli-Haefliger, D.** (1995). A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infect. Immun.* 6(9): 3279-3286
- Huygen, K.** (2006). DNA vaccines against mycobacterial diseases. *Future Microbiol.* 1:63-73
- Iwaki, M.; Okahashi, N.; Takahashi, I.; Kanamoto, T.; Sugita-Konishi, Y.; Aibara, K.; Koga, T.** (1990). Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun.* 58: 2929-2934
- Izadpanah, A.; Dwinell, M.B.; Eckmann, L.; Varki, N.M.; Kagnoff, M.F.** (2001). Regulated

MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280:710-9

**Jain, R.; Dey, B.; Dhar, N.; Rao, V.; Singh, R.; Gupta, U.D.; Katoch, V.M.; Ramanathan, V.D.; Tyagi, A.K.** (2008). Enhanced and Enduring Protection against Tuberculosis by Recombinant BCG-Ag85C and Its Association with Modulation of Cytokine Profile in Lung. *Plus One.* 3:1-11

**Jamet, E.** (2001). Thèse Etude de l'expression et de la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme carboné chez *Lactococcus lactis*. *Institut National Agronomique de Paris-Grignon*

**Jolly, C.; Morimoto, R.I.** (2000). Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst.* 92(19):1564-72

**Jun-Ming, L.I & Dao-yin, Z.H.U.** (2006). Therapeutic DNA vaccines against tuberculosis: a promising but arduous task. *Chinese Medical Journal.* 119(13):1103-1107

**Kagnoff, M. F. & Eckmann.; L.** (1997). Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest.* 100:6-10

**Kamath, A.T.; Rochat, A.F. ; Valenti, M.P. ; Agger, E.M.; Lingnau, K.; Andersen, P.; Lambert, P.H.; Siegrist, C.A.** (2008). Adult-Like Anti-Mycobacterial T Cell and In Vivo Dendritic Cell Responses Following Neonatal Immunization with Ag85B-ESAT-6 in the IC31H Adjuvant. *Plus One.* 3:1-10

**Kang, H.K.; Lee, H.Y.; Lee, Y.N.; Jo, E.J.; Kim, J.I.; Aosai, F.; Yano, A.; Kwak, J.Y.; Bae, Y.S.** (2004). Toxoplasma gondii-derived heat shock protein 70 stimulates the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 322(3):899-904

**Kaplan, C.; Valdez, J.C.; Chandrasekaran, R.; Eibel, H.; Mikecz, K.; Glant, T.T.; Finnegan, A.** (2001). Th1 and Th2 cytokines regulate proteoglycan-specific autoantibody isotypes and arthritis. *Arthritis Res.* 4:54-58

**Kaufmann, S.H.** (2002) Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis.* 2:54-8

**Kaufmann, S.H.** (2004) New issues in tuberculosis. *Ann Rheum Dis.* 63 (2):50-56

**Killeen, K.; Spriggs, D.; Mekalanos, J.** (1999). Bacterial mucosal vaccines: *Vibrio cholerae*

as a live attenuated vaccine/vector paradigm. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 236:237-254

**Kutzler, M. A. & Weiner, D.B.** (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 9:776-88

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685

**Lamm, M. E.** (1997). Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 51:311-40

**Langermans, J.A.M.; Doherty, T.M; Vervenne, R.A.W.; Laan, T. Van Der.; Lyashchenko, K.; Greenwald, R.** (2005). Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine.* 23:4935–43

**Le Loir, Y.; Azevedo, V.; Oliveira, S.C.; Freitas, D.A.; Miyoshi, A.; Bermudez-Humaran, L.G.; Nouaille, S.; Ribeiro, L.A.; Lececlercq, S.; Gabriel, J.E.; Guimaraes, V.D.; Oliveira, M.N.; Charlier, C.; Gautier, M.; Langella P.** (2005). Protein secretion in *Lactococcus lactis* : an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb Cell Fact.* 4(1):2

**Lee, M.H.; Roussel, Y.; Wilks, M.; Tabaqchali, S.** (2001). Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. *Vaccine.*19:3927–3935

**Li, J.M.; Zhu, D.Y.** (2006). Therapeutic DNA vaccines against tuberculosis: a promising but arduous task. *Chin Med J (Engl).* 119(13):1103-7

**Li, Z.; Kelley, C.; Collins, F.; Rouse, D.; Morris, S.** (1998). Expression of katG in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *J Infect Dis.* 177(4):1030-5

**Liang, Y.; Wu, X.; Zhang, J.; li, N. ; Yu, Q. ; Yang, Y. ; Bai, X. ; Liu, C.; Shi, Y.; Liu, Q.; Zhang, P.; Li, Z.** (2008). The treatment of mice infected with multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines or in combination with rofampicin. *Vaccine.* 26:4536-4540

**Lindquist, S.** (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem.* 55:1151-91



**Lindquist, S.** (1988). The Heat-Shock Proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22:631-77

**Liu, L.; Tran, V.; Leung, A.S.; Alexander, D.C.; Zhu, B.** (2009). BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines.* 5:2 70-78

**Llull, D. & Poquet, I.** (2004). New Expression System Tightly Controlled by Zinc Availability in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 : 5398–5406

**Loundon, R.G. & Roberts, R.M.** (1967). Droplet expulsion from the respiratory tract. *American Review of Respiratory Disease.* 95:435-442

**Lowrie, D. B.; Silva, C. L.; Ragno, C. S.; Tascon, R. E.** (1997). Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine.* 15 (8):834-838

**Lowrie, D.B. & Silva, C.L.** (2000). Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. *Vaccine.* 18:1712-1716

**Lowrie, D.B.; Tascon, R.E.; Bonato, V.L.; Lima, V.M.; Faccioli, L.H.; Stavropoulos, E.** (1999). Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature.* 400(674):269–71

**Lowrie, D.B.; Tascon, R.E.; Colston, M.J.; Silva, C.L.** (1994). Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine.* 12(16):1537-40

**Lugo, M.T.G.; Bewley, C.A.** (2008) Natural Products, Small Molecules, and Genetics in Tuberculosis Drug Development. *J. Med. Chem.* 51:2606-2612

**Macpherson, A. J.; Hunziker, L.; McCoy, K.; Lamarre, A.** (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non pathogenic microorganisms. *Microbes Infect. Rev.*;3: 1021-1035

**Madsen, S.M., Arnau, J., Vrang, A., Givskov, M. and Israelsen, H.** (1999). Molecular characterization of the pH-inducible and growth phase-dependent promoter P170 of *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol.* 32:75-87

**Magalhaes, I.; Sizemore, D.R.; Ahmed, R.K.; Mueller, S.; Wehlin, L.; Scanga, C.; Weichold, F.; Schirru, G.; Pau, M.G.; Goudsmit, J.; Kuhlmann-Berenzon, S.; Spangberg, M.; Andersson, J.; Gaines, H.; Thorstensson, R.; Skeiky, Y.A.W; Sadoff, J.;**

**Maeurer, M.** (2008). rBCG Induces Strong Antigen-Specific T Cell Response in Rhesus Macaques in a Prime-Boost Setting with an Adenovirus 35 Tuberculosis Vaccine Vector. *Plos ONE*. 3:1-7

**Manabe, Y.C.; Scott, C.P.; Bishai, W.R.** (2002). Naturally attenuated, orally administered *Mycobacterium microti* as a tuberculosis vaccine is better than subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*. 70:1566–70

**Martin, C.** (2005). The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? *Eur Respir J*. 26:162-167

**Martin, C.; Williams, A.; Hernandez-Pando, R.; Cardona, P.J.; Gormley, E.; Bordat, Y.; Soto, C.Y.; Clark, S.O.; Hatch, G.J.; Aguilar, D.; Ausina, V.; Gicquel, B.** (2006). The live *Mycobacterium tuberculosis phoP* mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Science*. 24:3408–3419

**Mazzaccaro RJ, Gedde M, Jensen ER, van Santen HM, Ploegh HL, Rock KL, Bloom BR.** (1996). Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(21):11786-91

**Mazzaccaro, R.J., Gedde, M., Jensen, E.R. Van Santem, H.M., Ploegh, H.L. Rock, K.L., Bloom, B.R.** (1996). Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Prod Natl acad Sci USA*.93:11786-11791

**McShane H, Pathan AA, Sander CR, Keating SM, Gilbert SC, Huygen K, Fletcher HA, Hill AV.** (2004). Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med*. 10(11):1240-4

**Medina, E. & Guzman, C.A.** (2001). Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine*. 19:1573-1580

**Mercenier, A.; Muller-Alouf, H.; Grangette, C.** (2000) Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol*. 2(1): 17-25

**Mierau, I.; Kleerebezem, M.** (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 68(6):705-17

**Miyoshi, A. ; Jamet, E. ; Commissaire, J. ; Renault, P. ; Langella, P. ; Azevedo, V.**

(2004). A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* 239(2):205-12

**Miyoshi, A. ; Poquet I. ; Azevedo, V. ; Commissaire, J. ; Bermudez-Humaran, L. ; Domakova E. ; Le Loir, Y.; Oliveira, C.; Gruss, A.; Langella.; P.** (2002). Controlled Production of Stable Heterologous Proteins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*68: 3141–3146

**Miyoshi, A.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Ribeiro, L.A.; Le Loir, Y.; Oliveira, S.C.; Langella, P.; Azevedo, V.** (2006). Heterologous expression of *Brucella abortus* GroEL heat-shock protein in *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories.* 5:1-8

**Mustafa, A.S.; Shaban, F.A.; Abal, A.T.; Al-Attayah, R.; Wiker, H.G.; Lundin, K.E.** (2000). Identification and HLA restriction of naturally derived Th-1 cell epitopes from the secreted *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 recognized by antigen-specific human CD4(+) T-cell lines. *Infect Immun.* 68:3933–40

**Netzer, W.J.; Hartl, F.U.** (1998). Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem Sci.* 23(2):68-73

**Neutra, M. R. & Kozlowski, P.A.** (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol.* 6:148-58

**Noll, A.; Autenrieth, I. B.** (1996). Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* HSP60 immunostimulating complexes or *Yersinia* HSP60 plus interleukin-12. *Infection and immunity.*; 64 (8):2955-2961

**Norton, P.M.; Le Page, R.W.; Wells, J.M.** (1995). Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiol.* 40(3):225-30

**Nouaille S.; Ribeiro, L.A.; Miyoshi, A.; Pontes, D.; Le Loir, Y.; Oliveira, S.C.; Langella, P.; Azevedo, V.** (2003) Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res.* 31;2(1):102-11

**Olsen A.W.; Williams, A.; Okets I.M.; Hatch, G.; Andersen, A.** (2004). Protective effect of a subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT- 6 in the aerosol guinea pig model. *Infect Immun.* 72:6146–50

**Perdigón, G., Fuller, R., Raya, R.** (2001) Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2(1): 27-42

**Pfyffer, G. E.; Auckenthaler, R.; Embden, J. D. A.; Soolingen, D.** (1998). *Mycobacterium canetti*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg Infect Dis.* 4(4): 631-4

**Piard, J. C.; Hautefort, I.; Fischetti, V. A.; Ehrlich, S. D.; Fons, M.; Gruss, A.** (1997). Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 179: 3068-3072

**Pieters, J.** (2008). *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell & Microbe Review.* 3:399-407

**Pontes, D.S.; Dorella, F.A.; Ribeiro, L.A.; Miyoshi, A.; Le Loir, Y.; Gruss, A.; Oliveira, S.C.; Langella, P.; Azevedo, V.** (2003). Induction of partial protection in mice after oral administration of *Lactococcus lactis* producing *Brucella abortus* L7/L12 antigen. *J Drug Target.* 11(8-10):489-93

**Poquet, I.; Saint, V.; Seznec, E.; Simoes, N.; Bolotin, A.; Gruss, A.** (2000). HtrA Is The Unique Surface Housekeeping Protease In *Lactococcus Lactis* And Is Required For Natural Protein Processing. *Mol Microbiol.* 35(5):1042-51

**Qie, Y.Q.; Wang, J.L.; Zhu, B.D.; Xu, Y.; Wang, Q.Z.; Chen, J.Z.; Wang, H.H.** (2008). Evaluation of a new Recombinant BCG which Contains Mycobacterial Antigen ag85B–mpt64190–198–mtb8.4 in C57.BL6 Mice. *Scandinavian Journal of Immunology.* 67:133–139

**Reed, S.; Lobet, Y.** (2005). Tuberculosis Vaccine Development: From Mouse To Man. *Microbes And Infect.* 7:922-931

**Reed, S.G.; Alderson, M.R.; Dalemans, W.; Lobet, Y.; Skeiky, Y.A.W.** (2003) Prospects For A Better Vaccine Against Tuberculosis. *Tuberculosis.* 83:213–9

**Reveneau, N.; Geoffroy, M. C.; Locht, C.; Chagnaud, P.; Mercenier, A.** (2002). Comparison Of The Immune Responses Induced By Local Immunizations With Recombinant *Lactobacillus Plantarum* Producing Tetanus Toxin Fragment C In Different Cellular Locations. *Vaccine.* 20:1769-1777

**Robinson, K.; Chamberlain, L.M.; Schofield, K.M.; Wells, J.M.; Le Page, R.W.** (1997).

Oral Vaccination Of Mice Against Tetanus Using Recombinant *Lactococcus Lactis*. *Nature Biotechnology*. 15: 653-657

**Rocha, C.S.** Construção de linhagens recombinantes de *Lactococcus lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada do antígeno Hsp65 de *Mycobacterium leprae*: desenvolvimento tecnológico do processo de obtenção da proteína recombinante e suas implicações científicas. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

**Rock, R.B.; Olin, M.; Baker, C.A.; Molitor, T.W.; Peterson, P.K.** (2008). Central Nervous System Tuberculosis: Pathogenesis And Clinical Aspects. *Clin. Microbiol.* 21:243-256

**Russell, D.G.** (2007). Who Puts The Tubercle In Tuberculosis? *Nat Rev Microbiol.* 5(1):39-47

**Sable, S.B., Kalra, M., Verma, I., And Khuller, G.K.** (2007). Tuberculosis Subunit Vaccine Design: The Conflict Of Antigenicity And Immunogenicity. *Clin Immunol*, 122: 239-251

**Salgame, P.** (2005). Host Innate And Th1 Responses And The Bacterial Factors That Control *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Curr Opin Immunol.* 17(4):374-80

**Scavone, P.; Miyoshi, A.; Rial, A.; Chabalgoity, A.; Langella, P.; Azevedo, V.; Zunino, P.** (2007). Intranasal Immunisation With Recombinant *Lactococcus Lactis* Displaying Either Anchored Or Secreted Forms Of *Proteus Mirabilis* Mrpa Fimbrial Protein Confers Specific Immune Response And Induces A Significant Reduction Of Kidney Bacterial Colonisation In Mice. *Microbes Infect.* 9(7):821-8

**Schmitt, E.; Gehrmann, M.; Brunet, M.; Multhoff, G.; Garrido, C.** (2007). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of Leukocyte Biology.* 81:15-27

**Segal, B.H., Wang, X.Y., Dennis, C.G., Youn, R., Repasky, E.A., Manjili, M.H., Subject, J.R.** (2006). Heat Shock Proteins As Vaccine Adjuvants In Infections And Cancer. *Drug Discovery Today.* 11:534-540

**Silva, C. L.** (1999). The Potencial use of Heat-Shock Proteins to Vaccinate Against Mycobacterial Infections. *Microbes And Infection.* 1:429-435

**Silva, C.L. & Lowrie, D.B.** (1994). A Single Mycobacterial Protein (Hsp65) Expressed By A

Transgenic Antigen-Presenting Cell Vaccinates Mice Against Tuberculosis. *Immunology*. 82(2):244-8

**Silva, C.L.; Bonato, V.L.D.; Lima, K.M.; Coelho-Castelo, A.A.M.; Faccioli, L.H.; Sartori, A.; De Souza, A.O.; Leão, S.C.** (2001). Cytotoxic T Cells And Mycobacteria. *Fems Microbiology Letters*. 197:11-18

**Sim, A.C.M.; Lin, W.; Tan, G.K.X.; Sim, M.S.T.; Chow, V.T.K.; Alonso, S.** (2008). Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type 2 upon mucosal administration of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing envelope domain III antigen. *Vaccine*. 26:1145—1154

**Skjot, R.L.; Oettinger, T.; Rosenkrands, I.; Ravn, P.; Brock, I.; Jacobsen, S.** (2000) Comparative Evaluation Of Low Molecular-Mass Proteins From *Mycobacterium Tuberculosis* Identifies Members Of The Esat-6 Family As Immuno-Dominant T-Cell Antigens. *Infect Immun*. 68(1):214–20

**Smith, D.; Wiegshaus, E.; Balasubramanian, V.** (2000). An Analysis Of Some Hypotheses Related To The Chingelput Bacilli Calmette Guerin Trial. *Clin Infect Dis*. 31:77–80

**Snider, J.D.E.; Montagne, J.R.L.** (1994). The Neglected Global Tuberculosis Problem: A Report Of The 1992 World Congress On Tuberculosis. *J. Infect. Dis*. 169:1189-1196

**Souza, M.V.N. & Vasconcelos, T.R.A.** (2005). Fármacos No Combate À Tuberculose: Passado, Presente E Futuro. *Quim. Nova*. 28:678-682

**Souza, P.R.M.; Zarate-Blades, C.R, Hori, J.I.; Ramos, S.G.; Lima, D.S.; Schneider,T.; Rosada, R.S.; Torre, L.G.L.; Santana, M.H.A.; Brandão, I.T.; Masson, A.P.; Coelho-Castelo, A.A.M.; Bonato, V.L.; galetti, F.C.S.; Gonçalves, E.D.; Botte, D.A.; Machado, J.B.M, Silva, C.L.** (2008). Protective efficacy of different strategies employing *Mycobacterium leprae* heat-shock protein 65 against tuberculosis. *Expert Opinion*. 8(9):1255-1264

**Steidler, L. & Rottiers, P.** (2006). Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. *Ann N Y Acad Sci*. 1072:176-86

**Stevenson, A. & Roberts, M.** (2003). Use Of *Bordetella Bronchiseptica* And *Bordetella*

*Pertussis* As Live Vaccines And Vectors For Heterologous Antigens. *Fems Immunol. Med. Microbiol.* 37:121-128

**Stewart, G.R.; Young, D.B.** (2004). Heat-Shock Proteins And The Host-Pathogen Interaction During Bacterial Infection. *Curr Opin Immunol.* 16(4):506-10

**Sugawara I, Udagawa T, Taniyama T.** (2007). Protective efficacy of recombinant (Ag85A) BCG Tokyo with Ag85A peptide boosting against *Mycobacterium tuberculosis* infected guinea pigs in comparison with that of DNA vaccine encoding Ag85A. *Tuberculosis.* 87:94–101

**Sugawara, I.;Sun, L.;Mizuno, S.;Taniyama, T.** (2009). Protective ef.cacy of recombinant BCG Tokyo (Ag85A) in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) infected intratracheally with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 89:62-67

**Suzuki, C.; Kimoto-Nira, H.; Kobayashi, M.; Nomura, M.; Sasaki, K.; Mizumachi, K.** (2008). Immunomodulatory and cytotoxic effects of various *Lactococcus* strains on the murine macrophage cell line J774.1. *Science.* 123:159-165

**Takayama, S.; Reed, J.C.; Homma, S.** (2003). Heat-Shock Proteins As Regulators Of Apoptosis. *Oncogene.* 22:9041-9047

**Tsenova, L.; Skeiky, Y.A.W.; Ellison, E.; Dalemans, W.; Reed, S.G.; Kaplan, G.** (2003). Anti-Tuberculosis Vaccine Evaluation Using A Rabbit Model. *Tb Vaccines For The World.* 50:17–19

**Van Asseldonk, M.; Rutten, G.; Oteman, M.; Siezen, R. J.; De Vos, W. M.; Simons, G.** (1990). Cloning, Expression In *Escherichia Coli* And Charaterization Of *Usp45*, A Gene Encoding A Highly Secreted Protein From *Lactococcus Lactis* Mg1363. *Gene.* 95: 155-160

**Vilasaró, M.N.; Fonta,B.; Sala,M.; Prera,M.; Malet,A.; Mariscal, D.; Segura, F.** (2008). Micobacteriosis genitourinaria: estudio retrospectivo de 45 casos en un hospital general. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 26(9):540-5

**Villena, J.; Medina, M.; Vintini, E.; Alvarez, S.** (2008). Stimulation of respiratory immunity by oral administration of *Lactococcus lactis*. *Can. J. Microbiol.* 54:630-638

**Walburger, A.; Koul, A.; Ferrari, G.; Nguyen, L.; Prescianotto-Baschong, C.; Huygen, K.; Klebl, B.; Thompson, C.; Bacher, G.; Pieters, J.** (2004). Protein kinase G from

pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science*. 304:1800-4

**Walburguer, A.A.; Koul, G.; Ferrari, L.; Nguyen, C.; Prescianotto-Baschong, K.; Huygen, B.; Klebl, C.; Thompson, G.; Bacher, Pieters, J.** (2004) Protein Kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science*. 304:1800-1804

**Wallis, R.S.** (2007). Reactivation of Latent Tuberculosis by Tnf Blockade: The Role of Interferon Gamma. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 12:16-21

**Wangoo, A.; Sparer, T.; Brown, I.N.; Snewin, V.A.; Janssen, R.; Thole, J.; Cook, H.T.; Shaw, R.J.; Young, D.B.** (2001) Contribution of Th1 and Th2 cells to protection and pathology in experimental models of granulomatous lung disease. *J Immunol*. 166(5):3432-9

**Wells, J. M.; Wilson, P. W.; Norton, P. M.; Gasson, M. J.; Le Page, R. W.** (1993). *Lactococcus Lactis*: High-Level Expression Of Tetanus Toxin Fragment C And Protection Against Lethal Challenge. *Mol. Microbiol*. 8:1155-1162

**Wells, J.M. & Mercenier, A.** (2008). Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature*. 1038:1-14

**Who.** (2004). Anti-Tuberculosis Drug Resistance In The World: Third Global Report/ The Who/luatld Global Project On Anti-Tuberculosis Drug Resistance. Surveillance, 1999-2002. World Health Organization, Geneva, Switzerland

**Who.** (2005). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Who Report 2005. Geneva, World Health Organization

**Xin, K.Q.; Hoshino, Y.; Toda, Y.; Igimi, S.; Kojima, Y.; Jounai, N.; Ohba, K.; Kushiro, A.; Kiwaki, M.; Hamajima, K.; Klinman, D.; Okuda, K.** (2003). Immunogenicity And Protective Efficacy Of Orally Administered Recombinant *Lactococcus Lactis* Expressing Surface-Bound *Hiv Env*. *Blood*. 102(1):223-8

**Xing, H.; Mayhew, C.N.; Cullen, K.E.; Park-Sarge, O.K.; Sarge, K.D.** (2004). Hsf1 Modulation Of Hsp70 Mrna Polyadenylation Via Interaction With Symplekin. *J Biol Chem*.

**Yadav, D.; Khuller, G.K.** (2001). Evaluation Of Immune Responses Directed Against 30 Kda Secretory Proteins Of *Mycobacterium Tuberculosis* H37ra Complexed In Different Adjuvants. *Indian J Exp Biol*. 39(12):1227-34

**Yoshida, T.; Sakamoto, A.; Iwamoto, Y.** (2009). Vascularized iliac bone graft in cases of



ankle tuberculosis. *J Reconstr Microsurg.* 25(2):125-31

**Zhang, Y.** (2005). The Magic Bullets And Tuberculosis Drug Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45:529-64

**Zhang, Z.H.; Jiang, P.H.; Li, N.J.; Shi, M.; Huang, W.** (2005). Oral vaccination of mice against rodent malaria with recombinant *Lactococcus lactis* expressing MSP-119. *World J Gastroenterol.*11(44):6975-6980

# ANEXOS

**Seção I** – Capítulo “Lactic Acid Bacteria as live vectors: Heterologous protein production and delivery systems”

O LGCM possui, há 10 anos, uma colaboração internacional, (Brasil – França, intermediada pelos órgãos financiadores CAPES e COFECUB) com o Laboratório de Pesquisa Leiteira e Genética Aplicada (URLGA) do Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica (INRA; Jouy en Josas, França); o qual visa promover o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas e terapêuticas para as Bactérias Lácticas (BL). Em colaboração com esse instituto, o LGCM já publicou diversos trabalhos relevantes sobre esse tema (busca pelos termos “*L. lactis*” e “Miyoshi”, <http://www.pubmed.gov>) e desenvolve, dessa maneira, um papel eminente no que diz respeito à utilização de *L. lactis* como vacinas de mucosa.

Uma vez que o LGCM apresenta importância no cenário mundial sobre o estudo das BL, o nosso grupo de pesquisa foi convidado para redigir um capítulo de livro em colaboração com o INRA, intitulado “*Lactic Acid Bacteria as live vectors: Heterologous protein production and delivery systems*” que será publicado no livro “*Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel applications*”. Acreditamos que esse capítulo, que se encontra no prelo publicação, contribuirá para o desenvolvimento de trabalhos científicos que serão realizados futuramente na área.

## Lactic Acid Bacteria as live vectors: Heterologous protein production and delivery systems

Anderson Miyoshi <sup>1,\*</sup>, Luis G. Bermúdez-Humarán <sup>2</sup>, Marcela Santiago Pacheco de Azevedo <sup>1</sup>, Philippe Langella <sup>2</sup>, Vasco Azevedo <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>: Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), Belo Horizonte-MG, Brasil.

<sup>2</sup>: Unité d'Écologie et Physiologie du Système Digestif (UEPSD), INRA Centre de Recherche de Jouy, Domaine de Vilvert 78352, Jouy en Josas, cedex, France

\*: corresponding authors (emails: vasco@icb.ufmg.br; miyoshi@icb.ufmg.br)

### Abstract.

Lactic acid bacteria (LAB), widely used in the food industry, are present in the intestine of most animals, including humans. The potential use of these bacteria as live vehicles for the production and delivery of heterologous proteins of vaccinal, medical or technological interest has therefore been extensively investigated. *Lactococcus lactis*, a LAB species, is a potential candidate for the production of biologically useful proteins. Several delivery systems have been developed to target heterologous proteins to a specific cell location (i.e., cytoplasm, cell wall or extracellular medium). A promising application of *L. lactis* is its use as an antigen delivery vehicle, for the development of live mucosal vaccines. The expression of heterologous proteins and antigens as well as the various delivery systems developed in *L. lactis*, and its use as an oral vaccine carrier are discussed.

### Introduction.

Lactic acid bacteria (LAB), ingested daily by humans, are widely used in the food industry for the production and the preservation of fermented products. LAB include a large number of Gram-positive cocci or bacilli belonging to a phylogenetically heterogeneous group. Their traditional use in the food industry confirms their lack of pathogenicity; they are generally regarded as safe (GRAS) organisms.

Since the 1980s, many efforts have been made to better understand the molecular basis of LAB's technological properties and to obtain better control of industrial processes involving LAB. This knowledge has led scientists to investigate their potential use in new applications, such as the production of heterologous proteins in bioreactors, in fermented food products or directly in the digestive tract of humans and other animals. Some LAB, used as probiotic strains, naturally exert a positive action in lactose-intolerant consumers by

providing lactase in the gut (de Vrese *et al.* 2001; Seegers 2002). Besides such natural benefits, another and innovative application of LAB is the delivery of digestive enzymes to supplement pancreatic deficiency in humans. Some recombinant strains producing lipase have already been used with success in animals (Drouault *et al.* 2000; 2002). A new application for LAB, and probably the most promising, is their use as live delivery vectors for antigenic or therapeutic protein delivery to mucosal surfaces. Such engineered LAB are able to elicit both mucosal and systemic immune responses. Several research projects have examined *Lactobacillus* sp. and *Lactococcus* sp. as vectors. Efficient expression systems have already been developed for controlled and targeted production of the desired antigen to be presented to the gastrointestinal mucosal immune system (Wells *et al.* 1993b; Norton *et al.* 1995; Le Loir *et al.* 2001).

In this chapter, we describe advances concerning the use of LAB as live delivery vectors, focusing on *Lactococcus lactis*, the LAB model. Various molecular tools have been developed to efficiently express antigens and therapeutic molecules at different cellular localizations. We report here on the systems developed to use *L. lactis* as a live vaccine and the effects of such an antigen presentation mode on the mucosal immune system.

**LAB: the context behind their use as live vectors.**

The lactic acid bacteria constitute a very heterogeneous group of microorganisms that occupy a wide range of ecological niches, from plant surfaces to animal guts. Although they are quite diverse, the members of this group have various characteristics in common, including: (i) Gram-positive; (ii) facultative anaerobes; (iii) non-spore forming; (iv) non-motile; and, principally (v) possess the capacity to convert sugars mainly into lactic acid, which led to naming this group "Lactic acid bacteria" (LAB). Currently, the LAB group includes species of the genera *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* and *Weissella*, which have less than 55% G+C content in their DNA (Stiles and Holzapel 1997).

**Industrial importance of LAB.**

LAB, with few exceptions, obtain their energy from the conversion of sugars, mainly glucose, into lactic acid (homofermentative or homolactic routes) and/or lactic acid and other products (heterofermentative or mixed routes) (Carr *et al.* 2002). Consequently, LAB are, generally speaking, associated with the preparation of fermented foods, such as yogurt, cheese, acid milk, bread, butter, wine, sausages, pickles and silage. This process, known as "lactic fermentation of foods," goes back to about 8,000 B.C. and constitutes one of the most

ancient forms of food preservation and use of LAB by humans (Tailliez 2001). Food conservation is not only a consequence of acidifying the medium (pH 4.5 - 3.5), but is also due to the production of numerous antibacterial agents, such as bacteriocins and organic compounds (van de Guchte *et al.* 2001). These two factors inhibit the growth of an undesirable microbiota and/or are responsible for the development of desirable organoleptic properties, such as texture, aroma and flavor of the final product.

LAB in health and nutrition.

Among the various properties attributed to the LAB, perhaps the most ancient and controversial is their capacity to promote beneficial effects, known as “probiotic” properties, for human and animal health (Fuller and Gibson 1997).

Various species of LAB are claimed to act as probiotics, such as *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus reuteri*, and stand out for their therapeutic applications in the treatment and prevention of various disorders (Ouwehand *et al.* 2002).

Historically, the first application involved the ability to digest lactose. This sugar, abundant in milk products, is not tolerated by many people who have congenital lactase deficiency. Clinical manifestations include diarrhea, abdominal colic and flatulence. Curiously, these symptoms appear with milk ingestion, but are practically absent when yogurt is ingested. There are three explanations for this phenomenon: (i) live bacteria present in yogurt (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*) consume the lactose during yogurt production, (ii) live bacteria present in yogurt provide the deficient host with lactase supplement, and/or (iii) they stimulate the endogenous production of this enzyme by the intestinal mucosa of the host (Roberfroid 2000).

A second application of LAB probiotics would be protection against pathogenic microbes. In this case, LAB function as a barrier, impeding the colonization of the gastrointestinal tract by pathogenic bacteria. The most remarkable results have been obtained with some types of lactobacilli and bifidobacteria, which have been found to be particularly effective in treating diarrhea in newborns (Ouwehand *et al.* 2002).

Another well-established application is the stimulation of the immune system of the host. Among the lactobacilli, *Lact. casei* has been found to be capable of stimulating an immune response in children who take an oral vaccine against rotavirus; this virus causes acute diarrhea in infants and young children in developing countries (Ouwehand *et al.* 2002).

Although some of these therapeutic applications have been questioned, growing concerns about health and well-being, along with an interest in consuming natural foods, have drawn considerable attention to probiotics, especially in the dairy products industry.

Currently, many milk products containing probiotics are available on the market, fermented milk being the most common.

There is conclusive evidence that consuming live LAB induces probiotic effects. However, more information about their modes and mechanisms of action are needed before they can be considered for the prevention and treatment of diseases.

#### \$b\$ New and future uses of LAB.

At least three types of “non-food” use are envisaged for LAB: (i) production in fermentors of economically-important proteins, (ii) production of foods containing biotechnological proteins, and (iii) construction of live vaccines.

##### \$c\$ Production of proteins in fermentors.

A classic application consists of the use of LAB to produce economically-important molecules in fermentors. For this, the secretion of molecules would be advantageous compared to intracellular production because of: (i) the ease of purification of the final product, (ii) continuous cell culture, and (iii) avoiding the formation of intracellular protein aggregates (Langella and Le Loir 1999).

##### \$c\$ Production of proteins within foods.

Another application of LAB would be the production of enzymes within foods in order to: (i) modify organoleptic properties of the products, (ii) prevent the growth of undesirable microbiota, (iii) accelerate cheese maturation, (iv) optimize silage production, and (v) overcome individual digestive enzyme deficiencies, such as the lack of lipases. In this last case, supplementation with bacterial lipase could be a viable alternative. The efficacy of providing these enzymes via bacteria has been demonstrated in dogs (Suzuki *et al.* 1997) and pigs (Drouault *et al.* 2002) with experimentally-induced steatorrhea. In this latter case, a recombinant *L. lactis* strain expressing the *lip* gene (lipase) of *Staphylococcus aureus* (Drouault *et al.* 2000) was administered to pigs with pancreatic insufficiency, resulting in a 15% increase in the capacity to absorb lipids.

##### \$c\$ Construction of live vaccines.

The use of live microorganisms as cellular vehicles for the production and presentation of antigens has contributed significantly to the development of new vaccines.

Currently, most of these vehicles are derived from pathogenic microorganisms, such as: *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium bovis*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus anthracis*; attenuated strains of these species have been constructed or isolated (Medina and Guzmán 2001). However, there is some risk of reversion to a pathogenic status. This risk could be avoided by using non-pathogenic bacteria, such as LAB. Besides their GRAS category, some LAB have the capacity to colonize the gastrointestinal tract or the genital mucosa of animals and humans, making them excellent candidates for oral vaccines. Oral immunization has, among other advantages, the capacity to induce immunity through mucosal surfaces. These surfaces constitute one of the principal entrance points and the first line of defense of hosts against attack by pathogenic organisms (Mercenier 1999).

Some tests of live vaccines have been conducted with *L. lactis*, *Streptococcus gordonii* and *Lactobacillus* sp. (Medaglini *et al.* 1997; Chatel *et al.* 2001; Reveneau *et al.* 2002). In these trials, LAB functioned as vectors for the production and presentation of model antigens on mucosal surfaces. These LAB were able to stimulate a specific immune response in mice exposed via the intranasal and oral routes.

Other experiments were designed to use LAB, not only as antigen presenters, but also as mucosal adjuvants. In these cases, recombinant strains of *L. lactis* produced both the model antigens and interleukins 2 and 6 (IL2 and IL6); mucosal administration with these recombinant lactococci was shown to increase 10-15 times the antigen-specific immune response (Steidler *et al.* 1998). Various studies are underway, using *L. lactis* as a model microorganism, so that these “new potential uses” of LAB can become a reality. More details concerning the use of LAB as live vaccines are presented in this chapter.

**a** *Lactococcus lactis*, the model LAB.

*L. lactis* is a facultative and mesophilic heterofermentative bacterium (ideal growth temperature around 30°C) that is widely used in the dairy industry. Currently, *L. lactis* is the best characterized member of the LAB group and is considered the model organism of this group, not only because of its economic importance, but also because of the following features: (i) it has a completely sequenced genome (Bolotin *et al.* 1999); (ii) it is genetically easy to manipulate; and (iii) many genetic tools have already been developed for this species (de Vos 1999).

**b** The genetic organisation of *L. lactis*.



Genetic studies on *L. lactis* have been mainly conducted on two strains: *L. lactis* MG1363 (formerly *L. lactis* subsp. *cremoris*) and *L. lactis* IL1403 (formerly *L. lactis* subsp. *lactis*).

#### §§ The genome.

Analysis of the organization and comparison of the genome sequences of these two subspecies of *L. lactis* demonstrated that they have approximately 80% identity and that their genomes have large inversions (Le Bourgeois *et al.* 1995). These studies also showed that the genome of *L. lactis* MG1363 has mobilization genes different from *L. lactis* IL1403, which corroborates findings that the former species contains plasmids that permit growth in a wide range of environments.

Recently sequenced (Bolotin *et al.* 2001), the genome of *L. lactis* IL1403 has 2.36 mega bases and 35.4% G+C content. A total of 2,310 genes were identified, of which 86% code for proteins, 1.4% code for RNA and 12.6% are non-coding sequences. Two hundred and ninety-three genes from six prophages and 43 insertion sequences (IS) were also identified. The genome of *L. lactis* also has four operons containing competence genes; which means that this bacterium, like *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pyogenes*, would be able to go through natural DNA transformation.

New information generated from sequencing the genome of *L. lactis* is already aiding in the development of new strains of bacteria in the construction of expression systems for the production of biotechnologically-useful heterologous proteins and could, in the near future, improve commercial processes that involve bacteria, such as cheese aging.

#### §§ The plasmids.

As for other members of the LAB group, *L. lactis* can occupy a wide range of niches. The capacity to grow in environments such as milk are mainly due to genes found in plasmids that code for various proteins, including enzymes, which are essential for the metabolism of sugars and proteins, as well as bacteriocins and DNA-repair proteins (Dawat *et al.* 2000). The finding of these genes in extra-chromosomal DNA suggests that these abilities arose through horizontal transfer from phylogenetically related species, such as *S. thermophilus* (Guedon *et al.* 1995). This hypothesis is partly confirmed by the finding of the *cluA* gene in *L. lactis* MG1363. The protein coded by this gene possesses 1,243 amino acids and has homology with aggregation proteins previously described in other Gram-positive bacteria such as *Enterococcus* sp. and *Streptococcus* sp. (Godon *et al.* 1994). The

aggregation proteins are responsible for the initiation of bacterial conjugation, during which there is contact between the donor and receptor cells.

#### Control of gene expression.

Gene transcription begins when the sigma ( $\sigma$ ) subunit of RNA polymerase recognizes a specific region of the DNA. This region, called the “promoter,” is located upstream of a coding sequence or operon and is characterized by two sequences of hexanucleotides located around positions -35 (TTGACA) and -10 (TATAAT) relative to the site of the initiation of transcription. After the hexanucleotides are recognized, transcription begins.

Various promoters have been described for *L. lactis*, by systematic research (Kuipers *et al.* 1997) and by analyzing already identified genes. They have similar -35 (TTGACA) and -10 (TATAAT) sequences to those found in *Escherichia coli* and *B. subtilis* and a TG (thymine-guanine) motive is located one base pair before the sequence -10. The principal  $\sigma$  factor of *L. lactis*,  $\sigma^{39}$ , is coded by the *rpoD* gene (Araya-Kojima *et al.* 1995; Bolotin *et al.* 2001) and has homology with factors  $\sigma^{70}$  and  $\sigma^A$  from *E. coli* and *B. subtilis*, respectively. When the genome of *L. lactis* IL1403 was sequenced, a second sigma factor was identified (Bolotin *et al.* 2001).

Transcription terminates at the 3' end of the genes and operons, where a palindromic sequence of nucleotides rich in guanine and cytosine (GC) and thymine (T), called “transcriptional terminators”, signals the end of the process. Most of the genes and operons of *L. lactis* have such sequences.

In *L. lactis* the signals for the initiation of translation are similar to those already described for *E. coli* and *B. subtilis*. The ribosome-binding site (RBS) is complementary to the 3' sequence of rRNA 16S (3' CUUCCUCC 5') of *L. lactis* (Chiaruttini and Millet 1993). Although most of the initiation codons are AUG, there are other codons, such as GUG (van de Guchte *et al.* 1992).

#### Genetic tools for the production of heterologous proteins in *L. Lactis*.

The utilization of *L. lactis* as a “bioreactor” for the production of biotechnologically relevant proteins is a result of an accumulation, over the last 20 years, of knowledge concerning microbiology, biochemistry, immunology, and mainly, genetics. Numerous genetic tools have been developed and some are currently being used in *L. lactis* and in other species of LAB.

### §§ Cloning vectors.

Studies based on the identification and isolation of wild-type plasmids from *L. lactis* and other LAB have made it possible to develop various cloning vectors. Using molecular biology techniques, these plasmids have been manipulated so that they have become important tools for cloning and studying genes of interest, both those of prokaryotes and eukaryotes. They basically consist of: (i) origin of replication (*ori*), (ii) selection marker (gene) for antibiotic resistance, and (iii) multiple cloning site (MCS).

Among the vectors that are available, two have been intensively utilized: pAM $\beta$ 1 and pWV01 (Janni re *et al.* 1993). pAM $\beta$ 1 is a plasmid derived from *Enterococcus faecalis*, with a “theta” ( $\theta$ ) form of replication. Currently, low- and high-copy number versions are available, such as the vectors pIL252 and pIL253, respectively (Simon and Chopin 1988). On the other hand, the plasmid pWV01, from *L. lactis* subsp. *cremoris*, undergoes rolling-circle type replication. Different from pAM $\beta$ 1, pWV01 shows a wide spectrum of hosts that range from the LAB to Gram-negative microorganisms, such as *E. coli*. They also have low- and high-copy number versions, such as the vectors pGK1 and pGK12, respectively (Kok *et al.* 1984).

### §§ Expression and targeting systems of heterologous proteins.

The expression of heterologous proteins in *L. lactis* has been favored both by advances in genetic knowledge and by new developments in molecular biology techniques. Using this duet of tools to obtain increased levels of these proteins and control their production, various vectors containing constitutive or inductive promoters were developed and currently constitute the basis of all expression systems in *L. lactis* and other LAB.

### §§ Expression systems based on the *lac* operon.

One of the first expression systems for use in *L. lactis* was based on the promoter ( $P_{lac}$ ) and the regulator gene (*lacR*) of the *lac* operon. This operon causes the promoter  $P_{lac}$  to be induced (5 – 10 times) in the presence of lactose; transcription of the regulating gene (*lacR*) is repressed at the same rate (van Rooijen *et al.* 1992). However, a higher level of induction was needed for this system to be useful for protein production. Consequently, a new system, composed of three vectors, which combined the elements of the *lac* operon with elements of bacteriophage T7 (phage T7) of *E. coli* was developed (Wells *et al.* 1993b). In this new system, the open reading frame (ORF) that codes for RNA polymerase of phage T7 (T7 RNA pol.) was placed under the control of the  $P_{lac}$  promoter on the vector pILPol and the ORF of interest was placed in a second vector under the control of the T7 promoter. This

way, when lactose is added to the culture medium,  $P_{lac}$  induces the expression of the T7 RNA pol which activates the expression of the ORF of interest controlled by the T7 promoter. However, in order for the cell to be able to metabolize lactose in the medium, a third vector containing the *lac* operon is necessary. This system was first tested with fragment C of tetanus toxin (TTFC), a highly immunogenic model antigen, and was found to be capable of producing 22% of TTFC total cellular proteins. Mice immunized with *L. lactis* strains producing TTFC with this system were protected against lethal doses of tetanus toxin. Although it permitted control of gene expression and high levels of production, this expression system proved unviable because it consisted of three different vectors and three markers for resistance to antibiotics; the use of antibiotic markers also made it unviable for application in the food and pharmaceutical industries.

#### §§ Expression systems based on phage promoters.

Studies on the regulation of gene expression of phages infecting *L. lactis* MG1363 were the basis for the development of simpler expression systems, such as the “repressor-operator system” of the r1t phage of *L. lactis* (Nauta *et al.* 1996). In this system, and in the same vector, an ORF is placed under the control of the phage promoter  $P_{orf5}$  which is repressed by the phage protein Rro. When the mutagenic agent mitomycin C is added to the medium, the repressor protein, Rro, is proteolytically cleaved, with consequent release of the promoter  $P_{orf5}$ . Free from repression, the promoter induces the expression of the ORF that it controls. This system was tested using the reporter gene *lacZ* of *E. coli* and subsequently using the *acmA* gene (autolysin) of *L. lactis* MG1363. However, the use of mitomycin C as an inducer impedes the use of this system for the production of proteins in fermentors or in food products.

In another system, the genetic elements of phage  $\phi 31$  were used to develop an expression system that combines the  $P_{15A10}$  promoter and the origin of replication (*ori31*) (O’Sullivan *et al.* 1996). Here, as in the other systems, the ORF to be activated is cloned under the control of  $P_{15A10}$ , with the *ori31* on the same vector. After initiation of infection by the  $\phi 31$ , *ori31* is the target of the phage replication machinery and the number of copies of the vector in the cell is increased. Due to this increase, with the help of the  $P_{15A10}$  promoter, the level of expression is also increased. After cell lysis, caused by phage replication, the protein of interest is released into the medium. The greatest disadvantage of this system is the need for cell infection to obtain induction; this leads to the destruction of the cell culture, making the system unviable for industrial use.

#### §§ The nisin-controlled expression system.

One of the most promising and powerful expression systems that have been developed for use in LAB is based on genes involved in the biosynthesis and regulation of the antimicrobial peptide, nisin. Nisin is a small peptide produced and secreted by various strains of *L. lactis*, which is widely used as a natural preservative, due to its antimicrobial properties. Eleven genes (*nisABTCIPRKFE*G) are responsible for the production, modification and secretion of this peptide. The *nisA* gene encodes the 57-amino acid peptide precursor, nisin A; *nisBC* genes are involved with posttranslational modifications; *nisT* is needed for transport via the cytoplasmic membrane, while *nisP* is involved in the breakdown of the nisin precursor. The *nisI* gene, together with the *nisFEG* genes, codes for a lipoprotein that confers to the bacteria immunity against the nisin that it produces. Finally, *nisR* and *nisK* code for a two-component system (NisRK) which controls the expression of the 11 genes via signal transduction. NisK functions as a membrane sensor that detects the presence of extracellular nisin. The signal is subsequently transferred to NisR through a phosphorylation process that activates it. NisR is then able to activate gene transcription controlled by the promoters P<sub>*nisA*</sub> and P<sub>*nisF*</sub> (Kuipers *et al.* 1993).

Based on this information, various expression systems induced by nisin have been developed. Various expression vectors containing the P<sub>*nisA*</sub> promoter, followed by multiple-cloning sites for the insertion of ORFs to be expressed, are now available. These systems can be used in bacterial strains containing only the *nisR* and *nisK* genes in the chromosome, and the nisin concentration necessary for the induction of expression is minimal (0.01 – 10 ng/mL). Alternatively, *L. lactis* NZ9700 can be used as a nisin producer to express constitutively a specific protein (de Ruyter *et al.* 1996; Kuipers *et al.* 1998).

The “NICE” (nisin-controlled expression) system has been tested in other LAB, such as *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus helveticus*, demonstrating its versatility. As these bacteria do not have *nisRK* genes in their genomes, a two-vector system was developed (Kleerebezem *et al.* 1997) in which the P<sub>*nisA*</sub> promoter is fused to the specific ORF in one vector, and the *nisRK* genes are in a second vector. Later, this system was also used in other bacteria, such as *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp. (Eichenbaum *et al.* 1998) and *Lact. plantarum* (Pavan *et al.* 2000). Various heterologous proteins have already been expressed using this system; among all the systems that have been developed, this is the easiest to use and the one that gives the best yields.

§c§ The P170 expression system.

Several lactococcal promoters regulated by environmental conditions have also been isolated. Among them, P170 is a natural and strong promoter of an uncharacterized gene termed *orfX*, only active at low pH (pH < 6) and when cells enter the stationary growth phase of glucose-grown cultures (Bredmose *et al.* 2001; Madsen *et al.* 1999). P170 induction

depends on RcfB, a positive regulator of the CRP-FNR family of transcription regulators which binds to ACiD-boxes (Körner *et al.* 2003; Madsen *et al.* 2005). For protein production, P170 offers the major advantage (compared to the NICE system) of self-inducibility via lactic acid accumulation during growth. Using P170, the Staphylococcal nuclease (Nuc; Shortle 1983) yield of 300 mg/L has been achieved (Israelsen *et al.* 1995; Madsen *et al.* 1999).

#### Cellular targeting systems of heterologous proteins

A series of studies to develop new strains and efficient expression systems have been conducted to use LAB as “cell factories” for the production of proteins (Djordjevic and Klaenhammer 1998). However, in order for some of these proteins (enzymes and antigens) produced by bacteria to attain the desired biological activity levels, it is necessary that they correctly target specific cellular locations: (i) cytoplasm, (ii) membrane or (iii) extracellular environment.

In bacteria, protein targeting is accomplished via protein sequences or motifs. Among these, the signal peptide (SP) is a hydrophobic, poorly conserved, negatively charged motif, located at the amino-terminal (N-terminal) end of proteins naturally secreted by the cell. It is recognized and cleaved by the secretion machinery, which allows the protein to be transferred through the membrane and released into the extracellular medium. Another key sequence is cell wall anchoring signal (CWA; cell wall anchor), which is composed of 30 amino acids and is located at the carboxy-terminal (C-terminal) end of the protein. The CWA includes a conserved motif (LPXTG), which is recognized by the anchoring machinery. The protein, translocated to outside the cell, is covalently bound by the LPXTG motif to a glycan peptide. Although these motifs, along with secretion and anchoring mechanisms, were first characterized in *B. subtilis* (Simonen and Palva 1993) and *Staphylococcus aureus* (Ton-That *et al.* 1999), homologous systems are present in other Gram-positive bacteria, such as LAB (Fischetti *et al.* 1990).

Consequently, studies have been conducted to better understand and characterize the factors that participate in and influence the secretion of homologous and heterologous proteins in LAB. It is now known that few proteins are secreted in *L. lactis*; among these, Usp45 was found. This protein, whose function is unknown, is the only one secreted in quantities large enough to be detected in Coomassie stained protein gels (van Asseldonk *et al.* 1990). It is also known that *L. lactis* is able to recognize secretion (SP) and anchoring (CWA) motifs of bacteria such as *S. aureus* and *S. pyogenes* (Le Loir *et al.* 1994; Piard *et al.* 1997). Based on this knowledge and on previously developed expression systems, some expression and targeting systems of heterologous proteins have been constructed.

One of the first expression and targeting systems of heterologous proteins constructed to be used in *L. lactis* was based on the T7 RNA pol system. In this system, the

T7 promoter is fused to the DNA fragment that codes for the signal peptide of the Usp45 protein ( $SP_{Usp45}$ ), followed by the TTFC ORF. After induction of the system, the transcriptional fusion ( $sp_{Usp45}::TTFC$ ) was efficiently translated and the TTFC was secreted to the extracellular environment in significant quantities (2.9 mg/L) (Wells *et al.* 1993a).

A second, simpler and more efficient expression and targeting system was developed (Dieye *et al.* 2001) using elements such as the constitutive promoter  $P_{59}$  (*Streptococcus cremoris*; van der Vossen *et al.* 1987),  $SP_{Usp45}$  and the anchoring motif CWA of *S. pyogenes* M6 protein. This system made it possible for the model protein Nuc (*S. aureus* nuclease; Shortle 1983) to be directed to the cytoplasm, membrane and extracellular medium. For cytoplasmic production, the 5' end of the *nuc* ORF was simply fused to the  $P_{59}$  promoter. In order to anchor Nuc to the membrane, the 5' and 3' ends of *nuc* were respectively fused to  $sp_{Usp45}$  and  $cwa_{M6}$ . Finally, in order for Nuc to be exported to the extracellular medium, only a transcriptional fusion between  $sp_{Usp45}$  and *nuc* was necessary. Although this system made it possible to target Nuc to three different cellular compartments and was used successfully in *L. lactis* subsp. *cremoris* and *Lact. plantarum*, the protein production levels were low (2.5 - 3 mg/L), probably due to the low copies of the vector and to the extracellular protease, HtrA (Poquet *et al.* 2000).

Therefore, a third system was constructed. Its objective was not only to target heterologous proteins to outside the cell, but also to control and increase gene expression (Le Loir *et al.* 2001). In a previous study (Le Loir *et al.* 1998), it was found that the efficiency of Nuc protein secretion was low (3 mg/L), probably due to the positive charges (+3) of its own signal peptide. A synthetic propeptide, LEISSTCDA, which has a negative charge (-2), was developed. When fused to the coding sequence of the N-terminal end of Nuc, this propeptide was able to increase the efficiency of secretion of Nuc five times (15 mg/L). In a second stage, in order to increase the levels of expression, the coding sequence of the signal peptide of Usp45 ( $sp_{Usp45}$ ) was cloned together with the *nuc* ORF in a high copy number vector, under the control of the  $P_{nisA}$  promoter. Next, in order for Nuc to be efficiently recognized by the cell secretion machinery, the coding sequence of the synthetic propeptide LEISSTCDA, was cloned between  $sp_{Usp45}$  and the 5' end of *nuc* ORF ( $P_{nisA}::sp_{Usp45}::LEISSTCDA::nuc$ ); this resulted in high levels of Nuc in the extracellular medium (25 mg/L). Currently, this system has been used successfully to express and target various biotechnologically important heterologous proteins and it is among the best genetic tools available (Nouaille *et al.* 2003; Le Loir *et al.* 2005).

Another expression and targeting system that figures among the ones previously mentioned is the xylose-inducible expression system (XIES) which is based on the use of a xylose-inducible lactococcal promoter,  $P_{xyIT}$  (Jamet 2001). The capacity of this system to cytoplasmic and secreted proteins was initially tested using the coding sequence of the

Staphylococcal nuclease (*nuc*) fused or not to the lactococcal Usp45 signal peptide coding sequence. Xylose-inducible *nuc* expression was found to be tightly controlled and resulted in high-level, long-term protein production and targeting either to the cytoplasm or to the extracellular medium. Furthermore, this expression system is versatile and can be easily switched on or off by adding either xylose or glucose, respectively (Miyoshi *et al.* 2004).

Recently, a new expression system called  $P_{Zn}$  *zitR* has been developed in *L. lactis*. With excess zinc in the medium, ZitR binds to  $P_{Zn}$  and represses expression by competing with RNA polymerase binding. Alternatively, under extreme zinc starvation, ZitR becomes inactive and allows RNA polymerase binding to initiate  $P_{Zn}$  transcription. This lactococcal expression/secretion system uses a consensus signal peptide, SP<sub>Exp4</sub> that allowed efficient production of Nuc and  $\beta$ -galactosidase. This production process is of particular interest because it is inexpensive and compatible with large-scale production (Lull and Poquet, 2004; Morello *et al.* 2008).

#### Genetically modified strains.

One of the biggest problems found in the production of specific proteins in wild-type strains is low yield, due to intrinsic cellular factors, such as: (i) instability of the messenger RNA, (ii) toxicity of the recombinant protein, and mainly (iii) protein instability. Protein instability is frequently attributed to intra- and extracellular proteolytic systems, found both in Gram-negative and Gram-positive bacteria. A variety of these systems have already been described in *E. coli* and *B. subtilis*; they involve diverse physiological functions, such as protein degradation, assimilation of nutrients, such as peptides and amino acids, and degradation of proteins that are malformed and/or foreign to the cell (heterologous) (Gottesman 1996). Unlike from these bacteria, *L. lactis* has only one extracellular protease, HtrA (Poquet *et al.* 2000), which is responsible not only for the propeptide processing and maturation of wild-type proteins, but also for allowing cells to grow at high temperatures, such as 37°C. Inactivation of the *htrA* gene in *L. lactis* strain IL1403 demonstrated that this membrane protease is also the main enzyme responsible for degrading heterologous proteins. The results obtained with the production of specific proteins in this strain demonstrate that this mutant is capable of completely stabilizing these proteins, that is, no degradation due to proteases was observed. We conclude that this *L. lactis* strain constitutes an important tool for the production of biotechnologically useful proteins.

Another important element in the production of heterologous proteins is the selection markers (genes for resistance to antibiotics). Present in cloning and expression vectors, these types of markers are widely used in laboratories to select and maintain cells that carry recombinant plasmids. However, their use in the food and pharmaceutical industries is not



considered acceptable due to the presence of antibiotics in the final product and because of contamination of the environment. Currently, this problem is being overcome by constructing auxotrophic bacterial strains, the deficiencies of which are corrected by including the wild-type gene in a cloning or expression vector (Henriksen *et al.* 1999). The first selection system that did not include antibiotics was based on complementation of a chromosomal gene *lacF* of the *lac* operon. Expression of the *lacF* gene in a cloning vector resulted in complementation of the *lac*<sup>-</sup> phenotype, allowing selection of clones carrying this vector in culture medium supplemented with lactose (Dickely *et al.* 1995). Since then, other auxotrophic strains of *L. lactis* have been developed, leading to the establishment of “food-grade” systems which could be used to produce proteins directly in food or in large-scale fermentations, without selection markers.

Two systems based on threonine- and pyrimidine-auxotroph derivative *L. lactis* strains allow the cloning and efficient expression of heterologous and homologous proteins in various industrial strains (Sorensen *et al.* 2000; Glenting *et al.* 2002). These two systems are stable, and do not impair growth and important properties, such as milk acidification. Because of the absence of selection markers and also foreign DNA, strains using these systems maintain their food-grade status.

A large number of expression vectors are now available in *L. lactis* with different strengths and regulation systems; some of them exerting strong activity and tight regulation. They constitute powerful tools to control heterologous protein production in terms of quantities, timed expression and conditions.

LAB as live vaccines.

Mucosal epithelia constitute barriers between the internal and the external environment and consequently are the first line of defense of animals against most of the pathogens that use this way of entry (Salminen *et al.* 1998). Therefore, strategies designed to fight against pathogens at mucosal surfaces are not only desirable but, in some instances, can be the only way to prevent infection. Recent advances in biotechnology and in the understanding of the immune system have now made it possible to develop new mucosal vaccines based on live bacterial vectors able to stimulate mucosal immunity.

Among the live bacterial vectors, two main types can be distinguished: those based on attenuated pathogens and those based on non-pathogenic bacteria (Brahmbhatt *et al.* 1992; Stevenson and Roberts 2003). Attenuated pathogenic bacteria are particularly well adapted to interact with mucosal surfaces as most of them use this portal to initiate infection. Unfortunately, these organisms could recover their pathogenic potential and are not totally safe for use in humans, especially in children and immunosuppressed patients.

Therefore, LAB would be an attractive alternative to attenuated pathogenic bacteria (Stahl *et al.* 1997; Lee 2003). In addition to their GRAS status, some LAB are able to stimulate the immune system of the host as adjuvants due to their probiotic properties and their immunomodulation capacity (Seegers 2002). Furthermore, LAB are poorly immunogenic, in contrast to pathogenic microorganisms which are themselves highly immunogenic, a feature that enables the repetitive use of the carrier in multi-schedule immunizations with the same or other antigens (Robinson *et al.* 1997; Chang *et al.* 2003).

The combination of these properties makes LAB very advantageous live vaccines, and various molecular tools have been developed to efficiently express antigens and therapeutic molecules at different cellular localizations in LAB (Wells *et al.* 1993b; Norton *et al.* 1995; Le Loir *et al.* 2001). Strikingly, mucosal administration with genetically engineered LAB has been shown to elicit both systemic and mucosal immunity (Robinson *et al.* 1997; Chang *et al.* 2003).

In particular, among the LAB, *L. lactis* is considered a potential candidate for the development of new safe mucosal vaccines because many genetic tools have been developed for it and because its complete genome is sequenced. However, the major advantage of the use of *L. lactis* as live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins resides in its extraordinary safety profile since this bacterium is catalogued as a non-invasive and non-pathogenic organism (Salminen *et al.* 1998).

The first attempt to study the potential of *L. lactis* as a mucosal vaccine was performed with killed recombinant lactococci producing a cell wall-attached form of a protective antigen (PAC) from *Streptococcus mutans*. Mice immunized orally with this recombinant strain developed a PAC-specific serum IgG and mucosal IgA antibodies (Iwaki *et al.* 1990). These results showed, for the first time, that *L. lactis* can be used as a delivery vector to present an antigen to the immune system.

The majority of studies using *L. lactis* as a live vector uses TTFC. Norton *et al.* (1995) observed a significant increase in the level of IgA after oral immunization in mice with recombinant strains producing TTFC. Other studies showed that mice immunized with recombinant strains of *L. lactis* producing intracellular TTFC develop significantly higher levels of IgG and TTFC-specific fecal IgA. These mice become more resistant to a lethal challenge with the tetanus toxin than do nonimmunized mice (Wells *et al.* 1993b; Robinson *et al.* 1997; Grangette *et al.* 2001).

Nevertheless, the most promising results were observed in *L. lactis* expressing cell wall-anchored E7, a major candidate antigen for vaccines against HPV-related cervical cancer, and a secreted form of interleukin-12 (IL-12). Therapeutic immunization with these *L. lactis* strains, after TC-1 injection, induced regression of palpable tumors in treated mice (Bermúdez-Humarán *et al.* 2005). These preclinical results suggest the feasibility of mucosal

vaccination and/or immunotherapy against HPV-related cervical cancer using genetically engineered lactococci.

Although the studies of LAB as delivery vehicles have focused mainly on the development of mucosal vaccines, these microorganisms have also been used as a delivery system for a range of molecules including allergens, enzymes and cytokines (Wells and Mercenier 2008). Clinical trials have revealed that interleukin-10 (IL-10) can reduce diarrheic disorders associated with inflammatory bowel disease. In mice, gastric administration of *L. lactis* secreting IL-10 reduced diarrheic symptoms by about one half and also prevented their development (Steidler *et al.* 2000). This genetically engineered strain has been approved by Dutch authorities to be used as an experimental therapy for humans (Steidler *et al.* 2003). This unique trial opens the possibility of the use and acceptance in humans of recombinant lactococci for vaccination and/or therapy.

In the last ten years, the capacity of *L. lactis* to produce antigens has been clearly demonstrated (Table 1) and in some cases, mucosal administration with these recombinant lactococci was shown to induce a successful mucosal and systemic immune response (Xin *et al.* 2003; Robinson *et al.* 2004).

Table 1: Protection studies with lactococci based vaccines (Wells and Mercenier, 2008; modified)

| Vaccine target                      | Vehicle          | Antigen (model)   | Model (route)                                   | Immune* responses   | Protection model (outcome)  |
|-------------------------------------|------------------|---|---|---|---|
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>     | <i>L. lactis</i> | PspA  | Mouse; intranasal                               | Serum antibody and BALF antibody                                  | Infectious lethal challenge intraperitoneally (increased survival)                      |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>       | <i>L. lactis</i> | C- repeat region of M protein serotype 6 (cell-wall associated) | Mouse; intranasal and subcutaneous              | Salivary IgA and serum antibody                                   | Pharyngeal infection (intranasal route; protective)                                     |
| HIV-1                               | <i>L. lactis</i> | V2-V4 loop of gp 120 (cell-wall associated)                     | Mouse; intragastric with cholera toxin adjuvant | Serum antibody, faecal antibody, ICCS, tetramer assay and ELISPOT | Intraperitoneal challenge with HIV-1 Env-expressing vaccinia virus (viral load reduced) |
| <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> | <i>L. lactis</i> | SpaA (cell-wall associated)                                     | Mouse; intranasal                               | Serum antibody and faecal IgA                                     | Challenge with <i>E. rhusiopathiae</i> (protection from death)                          |

|                              |                  |  |   |   |   |
|------------------------------|------------------|--|---|---|---|
| Rotavirus                    | <i>L. lactis</i> | VP7 (cytoplasmic, cell-wall associated and secreted) | Mouse; intragastric                                 | Serum antibody  | Virus neutralization assay (neutralizing antibody demonstrated for VP7; cell-wall associated vaccine) |
| Group B <i>Streptococcus</i> | <i>L. lactis</i> | Pilus (island 1) (cell-wall associated)              | Mouse; subcutaneous, intraperitoneal and intranasal | Serum antibody and antibodies in nasal and vaginal washes | Survival of offspring from vaccinated mothers after infectious challenge                              |
| <i>Brucella abortus</i>      | <i>L. lactis</i> | L7 or L12 (cytoplasmic)                              | Mouse; intragastric                                 | Faecal IgA  | Partial protection against intraperitoneal inoculation of virulent <i>B. abortus</i>                  |

\* Responses detected using any of the indicated vaccination routes. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; CTL, cytotoxic T lymphocyte; ELISPOT, enzyme-linked immunospot; ICCS, intracellular cytokine staining.

The capacity of the genus *Lactobacillus* to produce antigens has also been demonstrated (Table 2). The first studies proposing the use of genetically modified lactobacilli to produce heterologous proteins with the aim of developing a new generation of mucosal vaccines were carried out by Pouwels *et al.* (1996) and Rush *et al.* (1994) in the early 1990s. By the end of 1990s and early 2000s, several laboratories demonstrated interest in the use of recombinant lactobacilli (particularly *Lact. casei* and *Lact. plantarum*) as vehicles to deliver clinically relevant proteins at mucosal surfaces and stimulate both strong and local immune responses (Kruisselbrink *et al.* 2001; Poo *et al.* 2006; Chancey *et al.* 2006; Wu and Chung 2007; Campos *et al.* 2008; Yigang and Yijing 2008). Then, several peer-reviewed publications have been published, confirming the advantages of the genus *Lactobacillus* for live mucosal vaccines (Hanniffy *et al.* 2004; Mohamadzadeh *et al.* 2008; Wells and Mercenier 2008).

Table 2: Protection studies with lactobacilli based vaccines (Wells and Mercenier, 2008; modified)

| Vaccine target             | Vehicle   | Antigen (model)        | Model (route)                                     | Immune* responses                              | Protection model (outcome)                          |
|----------------------------|---|------------------------|---|--|---|
| <i>Helicobacter pylori</i> | <i>Lb. plantarum</i> and <i>Lb. plantarum</i> alr | Urease B (cytoplasmic) | Mouse ; intragastric                              | Serum antibody                                 | Colonization level (partial protection)             |
| Tetanus                    | <i>Lb. plantarum</i> and <i>Lb. plantarum</i>     | TTFC (cytoplasmic)     | Mouse ; intragastric, intranasal and intravaginal | Serum antibody, BALF, T cells and neutralizing | Survival after tetanus toxin challenge (protection) |

|                                | alr  |                        |   | antibody                                |   |
|--------------------------------|--|------------------------|---|---|---|
| <i>S. pneumoniae</i>           | <i>Lb. plantarum</i> and <i>Lb. helveticus</i> | PsaA                   | Mouse; intranasal                           | Antibody in serum, BALF and nasal wash  | Nasal colonization (reduction in pneumococcal load)                           |
| Enterotoxigenic <i>E. coli</i> | <i>Lb. acidophilus</i>                         | K99 fimbriae           | Pig; intestinal brush border <i>ex vivo</i> | Not applicable                          | Inhibition of K99 <i>E. coli</i> adhesion in porcine intestinal brush border  |
| SARS – associated coronavirus  | <i>Lb. casei</i>                               | Spike antigen segments | Mouse; intragastric and intranasal          | Serum antibody and mucosal IgA          | Viral neutralizing antibody elicited  |
| HPV16 induced tumours          | – <i>Lb. casei</i>                             | E7                     | Mouse; intragastric                         | Serum antibody, mucosal IgA and ELISPOT | Protection demonstrated against injection of E7 – expressing tumour cell line |

\* Responses detected using any of the indicated vaccination routes. *alr*, alanine racemase mutant; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; ELISPOT, enzyme-linked immunospot; HPV, human papillomavirus; SARS, severe acute respiratory syndrome; TTFC, tetanus toxin fragment C.

#### Conclusion.

The utilization of LAB for the production of biotechnologically important heterologous proteins, as well as for oral vaccines, is a visionary view that each day becomes a reality. As more information concerning this bacterial group is generated, new possibilities for their use are being contemplated. We consider that a complete tool box is now available for heterologous protein production and targeting in *L. lactis*, and will be extended to other LAB. These tools could lead to the construction of new food-grade live vaccines based on LAB. Such uses for vaccination purposes are promising for future therapeutic use of these bacteria. The most difficult tasks with this type of vaccination are to produce each antigen or cytokine in the precise cell location (cytoplasmic, anchored or secreted) and to regulate expression levels to induce the highest efficiency in immune response. For the moment, *L. lactis* is still the model LAB, and it is the easiest LAB to manipulate. Lactobacilli are being studied more and more because of their adjuvant properties, but in spite of these efforts, they are still more difficult to handle than lactococci. Two strategies should be followed in the future: i) laboratory production systems based on antibiotic resistance genes will be replaced by food-grade systems much better accepted by potential consumers, and ii) cocktails will be used of recombinant lactococci producing antigens and cytokines, and lactobacilli as probiotic adjuvants.

## References.

Araya-Kojima, T., Ishibashi, N., Shimamura, S., Tanaka, K. and Takahashi, H. (1995) Identification and molecular analysis of *Lactococcus lactis* rpoD operon. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**, 73-77.

Bermúdez-Humarán, L.G., Cortes-Perez, N.G., Lefèvre, F., Guimarães, V., Rabot, S., Alcocer-Gonzalez, J.M., Gratadoux, J.J., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R.S., Corthier, G., Gruss, A. and Langella P. (2005) A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol* **175**, 7297-7302.

Bolotin, A., Mauger, S., Malarme, K., Ehrlich, S.D. and Sorokin, A. (1999) Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 27-76.

Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. and Sorokin, A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* **11**, 731-753.

Brahmbhatt, H.N., Lindberg, A.A. and Timmis, K.N. (1992) Shigella lipopolysaccharide: structure, genetics, and vaccine development. *Curr Top Microbiol Immunol* **180**, 45-64.

Bredmose, L., Madsen, S.M., Vrang, A., Ravn, P., Johnsen, M.G., Glenting, J. and Israelsen, H. (2001) Development of a heterologous gene expression system for use in *Lactococcus lactis*: a novel Gram-positive expression system. In *Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells – A Comparative View on Host Physiology* ed. Merten, O-W., Mattanovich, D., Lang, C., Larsson, G., Neubauer, P., Porro, D., Postma, P., Teixeira de Mattos, J. and Cole, J.A. pp. 270-272. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Campos, I.B., Darrieux, M., Ferreira, D.M., Miyaji, E.N., Silva, D.A., Arêas, A.P., Aires, K.A., Leite, L.C., Ho, P.L. and Oliveira, M.L. (2008) Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the Pneumococcal Surface Protein A: induction of antibodies, complement deposition and partial protection against *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Microbes Infect* **10**, 481-488.

Carr, F.J., Chill, D. and Maida N. (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol* **28**, 281-370.

Chancey, C.J., Khanna, K.V., Seegers, J.F., Zhang, G.W., Hildreth, J., Langan, A. and Markham, R.B. (2006) Lactobacilli-expressed single-chain variable fragment (scFv) specific for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) blocks cell-associated HIV-1 transmission across a cervical epithelial monolayer. *J Immunol* **176**, 5627-5636.

Chang, T.L., Chang, C.H., Simpson, D.A., Xu, Q., Martin, P.K. Lagenaur, L.A., Schoolnok, G.K., Ho, D.D., Hillier, S.L., Holodniy, M., Lewicki, J.A. and Lee, P.P. (2003) Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 11672-11677.

Chatel, J.M., Langella, P., Adel-Patient, K., Commissaire, J., Wal, J.M. and Corthier, G. (2001) Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 545-551.

Chiaruttini, C. and Millet, M. (1993) Gene organization, primary structure and RNA processing analysis of a ribosomal operon in *Lactococcus lactis*. *J Mol Biol* **230**, 57-76.

de Ruyter, P.G., Kuipers, O.P. and de Vos, W.M. (1996) Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3662-3667.

de Vos, W.M. (1999) Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol* **2**, 289-295.

de Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C. and Schrezenmeir, J. (2001) Probiotics compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* **73**, 421S-429S.

Dickely, F., Nilsson, D., Hansen, E.B. and Johansen, E. (1995) Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning vector. *Mol Microbiol* **15**, 839-847.

Dieye, Y., Usai, S., Clier, F., Gruss, A. and Piard, J.C. (2001) Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol* **183**, 4157- 4166.

Djordjevic, G.M. and Klaenhammer, T.R. (1998) Inducible gene expression systems in *Lactococcus lactis*. *Mol Biotechnol* **9**, 127-139.

Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S.D. and Renault, P. (2000) Expression of the *Staphylococcus hyicus* lipase in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 588-598.

Drouault, S., Juste, C., Marteau, P., Renault, P. and Corthier, G. (2002) Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3166-3168.

Duwat, P., Hammer, K., Bolotin, A. and Gruss, A. (2000) Genetics of Lactococci. In *Gram-positive pathogens* ed. Fischetti, V.A. pp. 295-306. Washington DC: American Society for Microbiology.

Eichenbaum, Z., Federle, M.J., Marra, D., de Vos, W.M., Kuipers, O.P., Kleerebezem, M. and Scott, J.R. (1998) Use of the lactococcal *nisA* promoter to regulate gene expression in gram-positive bacteria: comparison of induction level and promoter strength. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2763-2769.

Fischetti, V.A., Pancholi, V. and Schneewind, O. (1990) Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface protein of gram-positive cocci. *Mol Microbiol* **4**, 1603-1605.

Fuller, R. and Gibson, G.R. (1997) Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand J Gastroenterol* **222**, 28-31.

Glenting, J., Madsen, S.M., Vrang, A., Fomsgaard, A. and Israelsen, H. (2002) A plasmid selection system in *Lactococcus lactis* and its use for gene expression in *L. lactis* and human kidney fibroblasts. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5051-5056.

Godon, J.J., Jury, K., Shearman, C.A. and Gasson, M.J. (1994) The *Lactococcus lactis* sex-factor aggregation gene *cluA*. *Mol Microbiol* **12**, 655-663.

Gottesman, S. (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **30**, 465-506.



Grangette, C., Muller-Alouf, H., Goudercourt, D., Geoffroy, M.C., Turneer, M. and Mercenier, A. (2001) Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun* **69**, 1547-1553.

Guedon, G., Bourgoïn, F., Pebay, M., Roussel, Y., Colmin, C., Simonet, J.M. and Decaris, B. (1995) Characterization and distribution of two insertion sequences, IS1191 and iso-IS981, in *Streptococcus thermophilus*: does intergeneric transfer of insertion sequences occur in lactic acid bacteria co-cultures? *Mol Microbiol* **16**, 69-78.

Hanniffy, S., Wiedermann, U., Repa, A., Mercenier, A., Daniel, C., Fioramonti, J., Tlaskolova, H., Kozakova, H., Israelsen, H., Madsen, S., Vrang, A., Hols, P., Delcour, J., Bron, P., Kleerebezem, M. and Wells, J. (2004) Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in human health. *Adv Appl Microbiol* **56**, 1-64.

Henriksen, C.M., Nilsson, D., Hansen, S. and Johansen, E. (1999) Industrial applications of genetically modified microorganisms: gene technology at Chr. Hansen A/S. *Int Dairy J* **9**, 17-23.

Israelsen, H., Madsen, S.M., Vrang, A., Hansen, E.B. and Johansen, E. (1995) Cloning and partial characterization of regulated promoters from *Lactococcus lactis* Tn917-lacZ integrants with the new promoter probe vector, pAK80. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2540-2547.

Iwaki, M., Okahashi, N., Takahashi, I., Kanamoto, T., Sugita Konishi, Y., Aibara, K. and Koga, T. (1990) Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun* **58**, 2929-2934.

Jamet, E. (2001) Thèse Etude de l'expression et de la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme carboné chez *Lactococcus lactis*. Institut National Agronomique de Paris-Grignon.

Jannièrè, L., Gruss, A. and Ehrlich, D. (1993) Plasmids. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics* ed. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. pp. 625-644. Washington DC: American Society for Microbiology.

Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M.M., Vaughan, E.E., de Vos, W.M. and Kuipers, O.P. (1997) Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-

inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4581-4584.

Kok, J., van der Vossen, J.M. and Venema, G. (1984) Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **48**, 726-731.

Körner, H., Sofia, H.J. and Zumft, W.G. (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 559-592.

Kruisselbrink, A., Heijine Den Bak-Glashouwer, M.J., Havenith, C.E., Thole, J.E. and Janssen, R (2001) Recombinant *Lactobacillus plantarum* inhibits house dust mite-specific T-cells responses. *Clin Exp Immunol* **126**, 2-8.

Kuipers, O.P., Beerthuysen, M.M., Siezen, R.J. and de Vos, W.M. (1993) Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur J Biochem* **216**, 281-291.

Kuipers, O.P., de Ruyter, P.G., Kleerebezem, M. and de Vos, W.M. (1997) Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol* **15**, 135-140.

Kuipers, O.P., de Ruyter, P.G., Kleerebezem, M. and de Vos, W.M. (1998) Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnology (NY)* **64**, 15-21.

Langella, P. and Le Loir, Y. (1999) Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Braz J Med Biol Res* **32**, 191-198.

Le Bourgeois, P., Lautier, M., van den Berghe, L., Gasson, M.J. and Ritzenthaler, P. (1995) Physical and genetic map of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 chromosome: comparison with that of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403 reveals a large genome inversion. *J Bacteriol* **177**, 2840-2850.

Le Loir, Y., Azevedo, V., Oliveira, S.C., Freitas, D.A., Miyoshi, A., Bermúdez-Humarán, L.G., Nouaille, S., Ribeiro, L.A., Leclercq, S., Gabriel, J.E., Guimaraes, V.D., Oliveira, M.N., Charlier, C., Gautier, M. and Langella, P. (2005) Protein secretion in *Lactococcus lactis* : an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb Cell Fact* **4**, 2.

Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, S.D. and Langella, P. (1994) Direct screening of recombinants in Gram-positive bacteria using the secreted Staphylococcal nuclease as a reporter. *J Bacteriol* **176**, 5135-5139.

Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, S.D. and Langella, P. (1998) A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **180**, 1895-1903.

Le Loir, Y., Nouaille, S., Commissaire, J., Bretigny, L., Gruss, A. and Langella, P. (2001) Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4119-4127.

Lee, S.F. (2003) Oral colonization and immune responses to *Streptococcus gordonii*: Potential use as a vector to induce antibodies against respiratory pathogens. *Curr Opin Infect Dis* **16**, 231-235.

Llull, D. and Poquet, I. (2004) New expression system tightly controlled by zinc availability in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5398–5406.

Madsen, S.M., Arnau, J., Vrang, A., Givskov, M. and Israelsen, H. (1999) Molecular characterization of the pH-inducible and growth phase-dependent promoter P170 of *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* **32**, 75-87.

Madsen, S.M., Hindre, T., Le Pennec, J.P., Israelsen, H. and Dufour, A. (2005) Two acid-inducible promoters from *Lactococcus lactis* require the cis-acting ACiD-box and the transcription regulator RcfB. *Mol Microbiol* **56**, 735–746.

Medagliani, D., Rush, C.M., Sestini, P. and Pozzi, G. (1997) Commensal bacteria as vectors for mucosal vaccines against sexually transmitted diseases: vaginal colonization with recombinant streptococci induces local and systemic antibodies in mice. *Vaccine* **15**, 1330-1337.

Medina, E. and Guzmán, C.A. (2001) Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* **19**, 1573-1580.

Mercenier, A. (1999) Lactic Acid Bacteria as live vaccines. In *Probiotics: A critical review* ed. Tannock, G. pp. 113-127. Wymondham: Horizon Scientific Press.

Miyoshi, A., Jamet, E., Commissaire, J., Renault, P., Langella, P. and Azevedo, V. (2004) A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* **239**, 205-212.

Mohamadzadeh, M., Duong, T., Hoover, T. and Klaenhammer, T.R. (2008) Targeting mucosal dendritic cells with microbial antigens from probiotic lactic acid bacteria. *Expert Rev Vaccines* **7**, 163-174.

Morello, E., Bermúdez-Humarán, L.G., Llull, D., Solé, V., Miraglio, N., Langella, P. and Poquet, I. (2008) *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol* **14**, 48-58.

Nauta, A., van Sinderen, D., Karsens, H., Smit, E., Venema, G. and Kok, J. (1996) Inducible gene expression mediated by a repressor-operator system isolated from *Lactococcus lactis* bacteriophage r1t. *Mol Microbiol* **19**, 1331-1341.

Norton, P.M., Le Page, R.W. and Wells, J.M. (1995) Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiol (Praha)*, **40**, 225-230.

Nouaille, S., Ribeiro, L.A., Miyoshi, A., Pontes, D., Le Loir, Y., Oliveira, S.C., Langella, P. and Azevedo, V. (2003) Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* **2**, 102-111.

O'Sullivan, D.J., Walker, S.A., West, S.G. and Klaenhammer, T.R. (1996) Development of an expression strategy using a lytic phage to trigger explosive plasmid amplification and gene expression. *Biotechnology (NY)* **14**, 82-87.

Ouwehand, A.C., Salminen, S. and Isolauri, E. (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 279-289.

Pavan, S., Hols, P., Delcour, J., Geoffroy, M.C., Grangette, C., Kleerebezem, M. and Mercenier, A. (2000) Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vivo biological effects. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4427-4432.

Piard, J.C., Hautefort, I., Fischetti, V.A., Ehrlich, S.D., Fons, M. and Gruss A. (1997) Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol* **179**, 3068-3072.

Poo, H., Pyo, H.M., Lee, T.Y., Yoon, S.W., Lee, J.S., Kim C.J., Sung, M.H. and Lee, S.H. (2006) Oral administration of human papillomavirus type 16 E7 displayed on *Lactobacillus casei* induces E7-specific antitumor effects in C57/BL6 mice. *Int J Cancer* **119**, 1702-1709.

Poquet, I., Saint, V., Sez nec, E., Simoes, N., Bolotin, A. and Gruss, A. (2000) HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol Microbiol* **35**, 1042-1051.

Pouwels, P.H., Leer, R.J. and Boersma, W.J.A. (1996) The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: Development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *J Biotechnol* **44**, 183-192.

Reveneau, N., Geoffroy, M.C., Locht, C., Chagnaud, P. and Mercenier, A. (2002) Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine* **20**, 1769-1777.

Roberfroid, M.B. (2000) Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr* **71**, 1682-1687.

Robinson, K., Chamberlain, L.M., Lopez, M.C., Rush, C.M., Marcotte, H., Le Page, R.W. and Wells, J.M. (2004) Mucosal and cellular immune responses elicited by recombinant *Lactococcus lactis* strains expressing tetanus toxin fragment C. *Infect Immun* **72**, 2753-27561.

Robinson, K., Chamberlain, L.M., Schofield, K.M., Wells, J.M. and Le Page, R.W. (1997) Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol* **15**, 653-657.

Rush, C.M., Hafner, L.M. and Timms, P. (1994) Genetic modification of a vaginal strain of *Lactobacillus fermentum* and its maintenance within the reproductive tract after intravaginal administration. *J Med Microbiol* **41**, 272-278.

Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. and Mattila-Sandholm, T. (1998) Demonstration of safety of probiotics – a review. *Int J Food Microbiol* **44**, 93-106.

Seegers, J.F. (2002) Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol* **20**, 508-515.

Shortle, D. (1983) A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. *Gene* **22**, 181-189.

Simon, D. and Chopin, A. (1988) Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie* **70**, 559-566.

Simonen, M. and Palva, I. (1993) Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol Rev* **57**, 109-137.

Sorensen, K.I., Larsen, R., Kibenich, A., Junge, M.P. and Johansen, E. (2000) A food-grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1253-1258.

Stahl, S., Samuelson, P., Hansson, M., Andréoni, C., Goetsch, L., Libon, C., Liljeqvist, S., Gunneriusson, E., Binz, H., Nguyen, T.N. and Uhlén, M. (1997) Development of non-pathogenic staphylococci as vaccine delivery vehicles. In *Recombinant Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization* ed. Wells, J.M. and Pozzi, G. pp. 61-81. New York: R. G. Landes Biomedical Publishers, Springer-Verlag.

Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W. and Remaut, E. (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* **289**, 1352-1355.

Steidler, L., Neiryck, S., Huyghebaert, N., Snoeck, V., Vermeire, A., Goddeeris, B., Cox, E., Remon, J.P. and Remaut, E. (2003) Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* **21**, 785-789.

Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K.M., Remaut, E., Le Page, R.W. and Wells, J.M. (1998) Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant

strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun* **66**, 3183-3189.

Stevenson, A. and Roberts, M. (2003) Use of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* as live vaccines and vectors for heterologous antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol* **37**, 121-128.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* **36**, 1-29.

Suzuki, A., Mizumoto, A., Sarr, M.G. and DiMagno, E.P. (1997) Bacterial lipase and high-fat diets in canine exocrine pancreatic insufficiency: a new therapy of steatorrhea? *Gastroenterology* **112**, 2048-2055.

Tailliez, P. (2001) Mini-revue: les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait* **81**, 1-11.

Ton-That, H., Liu, G., Mazmanian, S.K., Faull, K.F. and Schneewind, O. (1999) Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 12424-12429.

van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M., Siezen, R.J., de Vos, W.M. and Simons, G. (1990) Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene* **95**, 155-160.

van de Guchte, M., Ehrlich, S.D. and Maguin, E. (2001) Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J Appl Microbiol* **91**, 147-153.

van de Guchte, M., Kok, J. and Venema, G. (1992) Gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev* **88**, 73-92.

van der Vossen, J.M.B.M., van der Lelie, D. and Venema, G. (1987) Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl Environ Microbiol* **53**, 2452-2457.

van Rooijen, R.J., Gasson, M.J. and de Vos, W.M. (1992) Characterization of the *Lactococcus lactis* lactose operon promoter: contribution of flanking sequences and LacR repressor to its activity. *J Bacteriol* **174**, 2273-2280.

Wells, J.M. and Mercenier, A. (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* **14**, 1-14.

Wells, J.M., Wilson, P.W., Norton, P.M. and Le Page, R.W. (1993a) A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3954-3959.

Wells, J.M., Wilson, P.W., Norton, P.M., Gasson, M.J. and Le Page, R.W. (1993b) *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol Microbiol* **8**, 1155-1162.

Wu, C.M. and Chung, T.C. (2007) Mice protected by oral immunization with *Lactobacillus reuteri* secreting fusion protein of *Escherichia coli* enterotoxin subunit protein. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**, 354-365.

Xin, K.Q., Hoshino, Y., Toda, Y., Igimi, S., Kojima, Y., Jounai, N., Ohba, K., Kushiro, A., Kiwaki, M., Hamajima, K., Klinman, D. and Okuda, K. (2003) Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. *Blood* **102**, 223-228.

Yigang, X.U. and Yijing, L.I. (2008) Construction of recombinant *Lactobacillus casei* efficiently surface displayed and secreted porcine parvovirus VP2 protein and comparison of the immune responses induced by oral immunization. *Immunology* **124**, 68-75.



**Seção II – Currículo Lattes****Dados Pessoais****Nome:** Marcela Santiago Pacheco de Azevedo**Nome em citações bibliográficas:** AZEVEDO, M. S. P.**Sexo:** Feminino

---

**Formação Acadêmica/Titulação**

**2003 - 2006**      Graduação em Ciências Biológicas.  
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, PUC Minas, Belo Horizonte, Brasil  
Título: Isolamento e caracterização molecular e fenotípica de bactérias oriundas de minhocuçus (*Rhinodrilus alatus* e *Rhinodrilus* sp.)  
Orientador: Andréa Maria Amaral Nascimento  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

---

**Formação complementar**

**2003 - 2003**      Curso de curta duração em Mamíferos Aquáticos.  
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, PUC Minas, Belo Horizonte, Brasil

**2004 - 2004**      Curso de curta duração em Biologia Molecular.  
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, PUC Minas, Belo Horizonte, Brasil

**2006 - 2006**      Curso de curta duração em Clonagem e expressão gênica em bactérias Gram +. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

**2007 - 2007**      Curso de curta duração em Avaliação de riscos de novas construções genéticas. Associação Nacional de Biossegurança, ANBIO, Brasil

**2008 - 2008**      Curso de curta duração em I Curso de Inverno de Imunologia.  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

**2008 - 2008**      Curso de curta duração em Treinamento em BIOSSEGURANÇA.  
Farmacore Biotecnologia, FARMACORE , Ribeirao Preto, Brasil

**2008 - 2008**      Curso de curta duração em Noções básicas do sistema de gestão de qualidade. Farmacore Biotecnologia, FARMACORE , Ribeirao Preto, Brasil

---

**Atuação profissional**

**1.      Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG**  
**Vínculo institucional**

**2008 - Atual**      Vínculo: Aluna de mestrado, Enquadramento funcional: Mestranda, Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

**2007 - 2007**      Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

|                    |   |
|--------------------|---|
| <b>2005 - 2007</b> | Vínculo: Bolsista CNPq, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 20, Regime: Parcial |
| <b>2004 - 2005</b> | Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 20, Regime: Parcial    |

### Áreas de atuação

1. Genética Molecular e de Microorganismos

### Idiomas

- Inglês** Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

### Produção em C, T& A

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. PONTES, D. S., LIMA-BITTENCOURT, AZEVEDO, M. S. P., SOUZA, E. C., NASCIMENTO. Phenotypic and genetic analysis of *Enterobacter* spp. from a Brazilian oligotrophic freshwater lake. *Canadian Journal of Microbiology*. , v.53, p.983 - 991, 2007.

#### Capítulos de livros aceitos para publicação

1. MIYOSHI, A., BERMUDEZ, L., AZEVEDO, M. S. P., LANGELLA, P., AZEVEDO, V. A. C. Lactic Acid Bacteria as live vectors: Heterologous protein production and delivery systems In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, 2009  
*Áreas do conhecimento* : Genética,Imunologia,Microbiologia  
*Referências adicionais* : Argentina/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

#### Apresentação de Trabalho

1. AZEVEDO, M. S. P., LIMA-BITTENCOURT, DRUMOND, MARTINS, SOUZA, NASCIMENTO

**Análise da microbiota de *Rhinodrilus alatus* spp. e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos**, 2006. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais* : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Hotel Fonte Colina Verde; Cidade: São Pedro - SP; Inst.promotora/financiadora: Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz" Universidade de São Paulo

2. ALMEIDA, M. O., AZEVEDO, M. S. P., LIMA, F. A., COSTA, K. M., VIGUETTI, S. C. Z., AZEVEDO, V. A. C., MIYOSHI, A.

**Construção de linhagens de *Lactococcus lactis* produtoras da forma citoplasmática e secretada da quimosina bovina: desenvolvimento tecnológico do processo de obtenção da proteína recombinante e suas implicações biotecnológicas**, 2007. (Outra,Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais* : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Instituto de Ciências Biológicas; Cidade: Belo Horizonte; Evento: XVI Semana de Iniciação Científica da UFMG; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Minas Gerais

3. AZEVEDO, M. S. P., LANDA, G. G., JARDIM, B. F. M., Z Aidan, F. C., GUTIERREZ, M. J. A.

**Características do Fitoplâncton da Represa do Campus da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais**, 2005. (Outra,Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais; Cidade: Belo Horizonte; Evento: XIX Jornada de Biologia; Inst.promotora/financiadora: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais*

4. AZEVEDO, M. S. P., HIRSH, A., Z AidAN, F. C., JARDIM, B. F. M., GUTIERREZ, M. J. A. **Conservação de Didelphimorphia (Mammalia) no Brasil**, 2005. (Outra, Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais; Cidade: Belo Horizonte; Evento: XIX Jornada de Biologia; Inst.promotora/financiadora: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais*

## Eventos

### Participação em eventos

1. **VII Workshop em Imunologia**, 2008. (Congresso)
2. **V Congresso Brasileiro de Biossegurança e V Simpósio Latino Americano de Produtos Transgênicos**, 2007. (Congresso)
3. **II Workshop para treinamento sobre a utilização do BCH (Biosafety Clearing House)**, 2007. (Congresso)
4. **25 Reunião de Genética de Microrganismos**, 2006. (Congresso)
5. **XVII Jornada de Biologia**, 2004. (Outra)

### Organização de evento

1. ODA, L., AZEVEDO, M. S. P.

**V Congresso Brasileiro de Biossegurança e V Simpósio Latino Americano de Produtos transgênicos**, 2007. (Congresso, Organização de evento)

*Referências adicionais: Brasil/Português.*

---

## Totais de produção

### Produção bibliográfica

|  |   |
|--|---|
| Artigos completos publicado em periódico.....    | 1 |
| Capítulos de livros aceitos para publicação..... | 1 |
| Apresentações de Trabalhos (Congresso).....      | 1 |
| Apresentações de Trabalhos (Outra).....          | 3 |

### Eventos

|   |   |
|---|---|
| Participações em eventos (congresso)..... | 4 |
| Participações em eventos (outra).....     | 1 |
| Organização de evento (congresso).....    | 1 |

### Outras informações relevantes

- 1 Certificado de Cambridge FCE adquirido em dezembro de 2003

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)