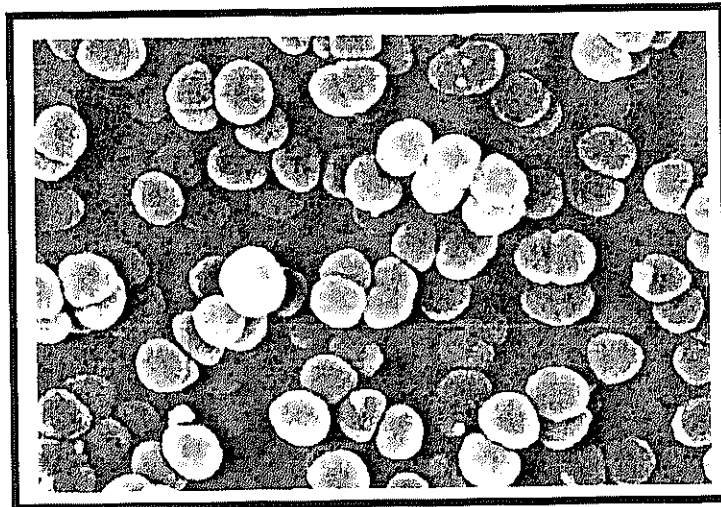


Daniela Santos Pontes

**CONSTRUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE LINHAGENS DE
LACTOCOCCUS LACTIS PRODUTORAS DE ANTÍGENOS
DA *BRUCELLA ABORTUS* COMO UMA NOVA
ESTRATÉGIA DE VACINAÇÃO ORAL CONTRA A
BRUCELOSE EXPERIMENTAL**



Belo Horizonte, 2003

UFMG

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Daniela Santos Pontes

**CONSTRUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE LINHAGENS DE
LACTOCOCCUS LACTIS PRODUTORAS DE ANTÍGENOS
DA *BRUCELLA ABORTUS* COMO UMA NOVA
ESTRATÉGIA DE VACINAÇÃO ORAL CONTRA A
BRUCELOSE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética..

Orientador: Prof. Vasco Azevedo.
Co-orientador: Prof. Sérgio C. Oliveira.

Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
2003

UFMG

ICB

043 Pontes, Daniela Santos
P813c Construção e utilização de linhagens de *Lactococcus lactis*
T produtoras de antígenos da *Brucella abortus* como uma nova
estratégia de vacinação oral contra a brucelose experimental. /
Daniela Santos Pontes. – Belo Horizonte : Universidade Federal
de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral, 2003.
VIII, 139 f. enc. : il., graf., tab.

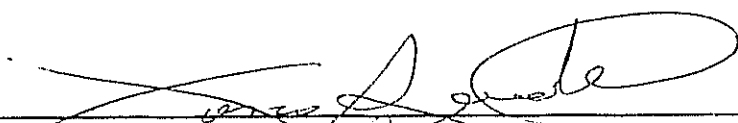
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas
Gerais, Departamento de Biologia Geral.

1. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses. 2.
Lactococcus – Genética – Teses. 3. Vacinas orais – Teses. 4.
Brucelose em bovino – Teses. I. Título. II. Universidade
Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral.

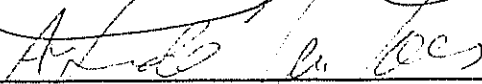


Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

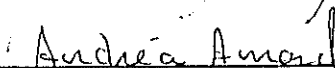
Dissertação defendida e aprovada, em 24 de janeiro de 2003, pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo



Prof. Alfredo Miranda de Góes



Profa. Andréa Maria Amaral Nascimento

*“Viver e não ter a vergonha de ser feliz,
Cantar, e cantar, e cantar
A beleza de ser um eterno aprendiz!”
Gonzaguinha.*

*Dedico este trabalho aos meus pais, pelo amor,
confiança e apoio, a toda minha família, ao Gú,
pelo constante amor e incentivo, e ao meu
orientador pelos ensinamentos científicos.*

AGRADECIMENTOS

- À Deus por sempre iluminar o meu caminho.
- Ao meu orientador, Professor Vasco Azevedo, pelas grandes oportunidades oferecidas, pelos ensinamentos científicos e pela confiança depositada em meu trabalho. Aprendi muitas coisas durante todos esses anos no LGCM. Obrigado por tudo!
- Ao meu co-orientador, Professor Sérgio Costa, pelos ensinamentos e atenção.
- Aos professores Alfredo Góes, Andrea Amaral e Jacques Nicoli, por participarem da banca examinadora.
- Ao Professor Alan Lane de Melo pelos ensinamentos, conselhos e ajuda.
- À Professora Patrícia Sommer pela sua consideração, atenção, dedicação e colaboração nas correções desta dissertação.
- À Professora Laíse S. Machado Coelho pelo carinho, atenção e correções desta dissertação.
- A todos os professores da Genética que contribuíram para minha formação.
- À Professora Ana Lúcia B. Godard pela ajuda e convívio.
- Aos amigos do LGCM: Miyoshi, Fê, Linovisck, Bruno e Éder Clebinho pela convivência diária, amizade, atenção, cumplicidade, pelo apoio nos momentos difíceis e por tudo de bom que passamos juntos. Vocês foram uma segunda família. Miyoshi, obrigada pela paciência e por ter me ensinado tantas coisas. Você é o exemplo de garra e conhecimento; Lino, valeu o companheirismo e o seu eterno bom humor; Fê, obrigada por ser simplesmente o meu braço direito! Você me ajudou muito e sempre esteve presente quando precisei, não sei o que seria de mim sem você! Bruno e Clebinho,

obrigada pela ajuda e pelo carinho de vocês! Vocês são tudo de bom e eu adoro todos vocês!

- Ao pessoal do LIDI: Grácia, Sophie, Kika, Gilson, Cinthia e Lili, obrigada pela ajuda, pela atenção e amizade. Valeu!
- A todo o pessoal do GIDE, em especial para Sr. Alberto e Zé Carlos, pela atenção, dedicação e ajuda. Vocês são pessoas maravilhosas!
- Às minhas amigas Quelzinha, Florence e Maria Rosa, pela oportunidade de ter trabalhado com vocês e pela amizade.
- À minha amiga Dani. Obrigada por tudo que me ensinou, pela nossa amizade, pelo carinho, pela sua atenção e disponibilidade em sempre me ajudar. Te adoro muito!
- À minha amiga Mônica, pela amizade, companheirismo e ao seu incondicional carinho. Você é uma pessoa iluminada! Adoro muito você!
- Aos amigos da turma de mestrado: Lino, Rodrigo, Miriam, Cris e Letícia pelo companheirismo e cumplicidade durante esse tempo que estivemos juntos!
- À Marina pela amizade e por ter sempre me ajudado. Obrigada pelos bons momentos de descontração e pelas risadas!
- À Kátia, que sempre foi amiga e sempre esteve a disposição para me ajudar. Você é o máximo!
- Ao Sr. Carlos pela ajuda diária.
- Ao Philippe Langella e Yves Le Loir pela credibilidade que depositaram no meu trabalho, pelos encontros agradáveis e pelo carinho. Muito obrigada!

- A Luciana Ribeiro pelo treinamento que recebi e pela oportunidade de trabalharmos juntas.
- As minhas amigas da lama: Kika, Flú, Jú, Rê, Kelly, Érika e Fabys pela amizade e apoio que sempre me deram! Vocês são tudo de bom! Adoro muito vocês!!!! L!!!!
- Aos amigos Renatinho, Breno, Bruno e Jairo pelo carinho e companheirismo.
- Aos meus amigos Gatinho e Príncipe pelas risadas e momentos de descontração.
- As minhas amigas Adriana e Vanessa. Adoro vocês!
- A minha super cunhada Lú pela amizade e carinho. Você é tudo de bom!
- A Joana e a Simone por cuidarem de mim e da minha bagunça. Obrigada por tudo que vocês fazem por mim!
- A minha prima Bina que sempre esteve ao meu lado, me dando a maior força, nos momentos felizes e nos momentos difíceis. Amo você!
- A minha irmã, Maíra, por todos esses anos que estamos juntas, pelo apoio, pela força e pela nossa eterna amizade!
- As minhas GRANDES AMIGAS: Rê, Lú, Gabi, Ana, Quel, Nina e Renatinha pela nossa eterna amizade! Obrigada pelo apoio e por terem torcido por mim. Amo vocês!
- Aos meus avós, que mesmo lá de cima, sempre estiveram ao meu lado.
- A minha maravilhosa e amada família: tios, tias, primos e primas, pela união, alegria, incentivo e apoio. Amo vocês!
- Aos meus queridos pais pelo apoio, conselhos, confiança, amizade, força e amor. Obrigada por acreditarem em mim! Esta conquista é nossa. Amo muito vocês!
- Aos meus irmãos, Alberto e Bruno, pelo carinho e amizade. Amo vocês!

- Ao Gú, pela constante compreensão, paciência, lealdade e amor. Obrigado por estar sempre ao meu lado, torcendo por mim! Te amo muito!!!
- Enfim a todas aquelas pessoas que de alguma forma me ajudaram durante a realização deste trabalho!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
INTRODUÇÃO.....	001
REVISÃO DA LITERATURA.....	003
1. As bactérias do ácido láctico.....	003
1.1. Características gerais	003
1.1.1. <i>Lactococcus lactis</i> : a bactéria do ácido láctico modelo.....	004
1.2. As bactérias do ácido láctico na indústria agro-alimentar.....	004
1.3. Atividades probióticas das bactérias do ácido láctico.....	006
1.4. Novas utilizações terapêuticas e tecnológicas das bactérias do ácido láctico.....	008
2. Sistemas de expressão e endereçamento celular de proteínas heterólogas em <i>L. lactis</i>	009
2.1. Expressão de proteínas heterólogas em <i>L. lactis</i>	009
2.1.1. Sistema de expressão NICE (Nisin Controlled Expression).....	011
2.2. Sistemas de endereçamento celular de proteínas heterólogas em <i>L. lactis</i>	012
3. Das proteínas heterólogas às vacinas vivas de mucosa	015
3.1. A utilização das bactérias do ácido láctico como vacinas vivas de mucosa.....	017

3.2. As bactérias do ácido láctico e o sistema imune de mucosas.....	020
4. Adjuvantes de mucosas.....	023
5. Linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> utilizadas como vacinas vivas.....	026
6. Linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> : utilização como vacinas orais contra brucelose.....	028
6.1. O gênero <i>Brucella</i>	028
6.2. A brucelose.....	029
6.3. Patogênese.....	030
6.4. Prevenção.....	031
6.5. A resposta imune.....	034
6.6. Antígenos da <i>B. abortus</i>	035
6.6.1. Proteína ribossomal L7/L12	037
6.6.2. GroEL e a família de proteínas de choque térmico.....	039
OBJETIVOS	042
MATERIAL E MÉTODOS	044
1. Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho.....	044
2. Condições de cultivo.....	046
3. Construção das linhagens de <i>L. lactis</i> produtoras da proteína de choque térmico GroEL da <i>B. abortus</i>	047
3.1. Clonagem intermediária em <i>E. coli</i>	047
3.1.1. Extração e dosagem do DNA plasmidiano.....	047
3.1.2. Amplificação do gene <i>GroEL</i> por PCR.....	047
3.1.3. Purificação do fragmento amplificado.....	048

3.1.4. Clonagem do gene GroEL de <i>B. abortus</i> no vetor pCRRII-TOPO.....	049
3.1.5. Verificação da presença e tamanho dos insertos dos clones.....	049
3.1.6. Confirmação do tamanho do inserto através da digestão enzimática das construções intermediárias.....	050
3.1.7. Resolução eletroforética e purificação do inserto.....	050
3.2. Sub-clonagem nos vetores que permitem a expressão da proteína no citoplasma (pVE3702), secretado no meio extracelular (pVE3684) e ancorada na parede celular (pVE3719).....	051
3.2.1. Digestão enzimática dos vetores pVE3702, pVE3684 e pVE3719	051
3.2.2. Obtenção de <i>E. coli</i> eletrocompetentes e eficiência de transformação.....	051
3.2.3. Ligação do gene <i>GroEL</i> nos vetores de expressão de <i>L. lactis</i>	053
3.3. Eletrotransformação em <i>E. coli</i>	053
3.4. Extração plasmidiana e seqüenciamento das construções para confirmação da clonagem do gene <i>GroEL</i>	054
3.5. Obtenção de <i>L. lactis</i> eletrocompetentes.....	055
3.6. Eletrotransformação em <i>L. lactis</i>	055
4. Extração plasmidiana em <i>L. lactis</i>	056
5. Extração de proteínas totais em <i>L. lactis</i>	057
6. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	058
7. “Western blot”.....	058
8. Expressão e purificação da proteína recombinante MBP:L7/L12 da <i>B. abortus</i> em <i>E. coli</i> para o uso como antígeno	059
8.1. Expressão da proteína MBP-L7/L12 da <i>B. abortus</i> em <i>E. coli</i>	059

8.2. Purificação da proteína de fusão MBP-L7/L12 pela cromatografia de afinidade em resina de amilose.....	059
9. Indução pela nisina do gene <i>L7/L12</i> da <i>B. abortus</i> clonado nos vetores de expressão em <i>L. lactis</i> e análise do crescimento das linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i>	060
10. Animais experimentais.....	061
11. Preparação das vacinas para imunização.....	061
12. Imunizações de camundongos BALB/c com linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> e a utilização de adjuvantes de mucosa.....	062
12.1. Imunizações utilizando linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> produtoras de L7/L12	062
12.2. Imunização em associação com linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> produtoras da interleucina-12.....	062
12.3. Imunização em associação com a linhagem probiótica de <i>Lb. delbrueckii</i>	063
12.4. Imunização em associação com o adjuvante de mucosa LT(R192G).....	063
12.5. Imunização com a linhagem S19 da <i>B. abortus</i>	064
13. Coletas de sangue.....	064
14. Coleta de fezes.....	064
15. Análise da resposta imune humoral.....	065
15.1. ELISA para detecção de anticorpos antígeno- específicos no soro e nas fezes.....	065
16. Análise de proteção após o desafio.....	066
17. Análises estatísticas dos dados.....	066
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	067

1. Ensaio de imunização contra a brucelose experimental utilizando linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> produtoras da proteína L7/L12 da <i>B. abortus</i>	068
1.1. Produção da proteína L7/L12 da <i>B. abortus</i> nas linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i>	068
1.2. Determinação da dose da vacina a ser administrada pela via intragástrica	071
1.3. Ensaio piloto de imunização	073
1.3.1. Indução da resposta imune de mucosa anti-L7/L12 pela via intragástrica	073
1.4. Ensaio de imunização utilizando a linhagem pCYT:L7/L12 associada a adjuvantes de mucosa.	077
1.5. Novos ensaios de imunização	078
1.5.1. Proteção contra a brucelose experimental	079
2. Construção de linhagens de <i>L. lactis</i> expressando a proteína GroEL da <i>B. abortus</i>	081
2.1. Amplificação e mutagênese dirigida do gene <i>GroEL</i> por PCR	081
2.2. Clonagem e verificação da presença dos fragmentos amplificados no vetor pCR _R II-TOPO	082
2.3. Sub-clonagem do gene <i>GroEL</i> da <i>B. abortus</i> nos vetores de expressão para a produção da proteína nas formas citoplasmática (pVE3702) e secretada (pVE3684 e pVE3719)	083

2.4. Análise da expressão do gene <i>GroEL</i> da <i>B. abortus</i> nas linhagens recombinantes de <i>L. lactis</i> pela técnica de "western blot"	084
CONCLUSÕES	087
PERSPECTIVAS	089
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	090
ANEXO I	118
ANEXO II	122

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	- Células apresentadoras de antígenos
ATP	- Adenosina trifosfato
BB	- Meio de cultivo " <u>B</u> rucella <u>B</u> roth"
BCIP	- 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt
BAL	- <u>B</u> actérias do <u>Á</u> cido <u>L</u> áctico
BSA	- Soro albumina bovina
CWA	- " <u>C</u> ell <u>W</u> all <u>A</u> nchor"
DNA	- <u>Á</u> cido desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfato
D.O ₆₀₀	- <u>D</u> ensidade <u>ó</u> tica em comprimento de onda de 600 nm
DTT	- Ditioeritritol
EDTA	- <u>Á</u> cido etilenodiaminotetracético
ELISA	- Ensaio de absorção imunoenzimático
glu	- Glucose
GRAS	- " <u>G</u> enerally <u>R</u> egarded <u>A</u> s <u>S</u> afe"
IFN γ	- Interferon gama
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
IPTG	- Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	- Kilobase
kDa	- Kilodalton

L	- Litro
LB	- Meio de cultura Luria Bertani
LPS	- Lipossacarídeo
M	- Molar
mA	- MiliAmper
MBP	- " <u>M</u> altose <u>B</u> inding <u>P</u> rotein"
min	- Minuto
ml	- Mililitro (10^{-3} L)
mM	- Milimolar
NBT	- " <u>N</u> itroblue <u>T</u> etrazolium <u>C</u> hloride
ng	- Nanograma (10^{-3} g)
NK	- " <u>N</u> atural <u>K</u> iller cells"
pb	- Pares de base
PBS	- " <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer <u>S</u> olution"
PCR	- " <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction"
pmole	- Picomole
PMSF	- <u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>S</u> ulfonil <u>F</u> luoride
PP	- <u>P</u> lacas de <u>P</u> eyer
PS	- <u>P</u> eptídeo <u>S</u> inal
Rnase	- Ribonuclease
rRNA	- Ácido ribonucléico ribossômico
rpm	- <u>R</u> otações pelo <u>m</u> inuto
SDS	- " <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate"
TAE	- Tampão Tris acetato de EDTA

TCA	- Ácido tricloacético
UFC	- <u>U</u> nidade <u>f</u> ormadora de <u>co</u> lônias
V	- Voltz
X GAL	- 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo
W	- Watts
μ FD	- Microfaraday
μ g	- Micrograma (10^{-3} g)
μ l	- Microlitro (10^{-3} L)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Fotos de cinco gêneros bacterianos que compõe o grupo das bactérias do ácido láctico.

FIGURA 2: O sistema de expressão NICE (de Ruyter *et al.*, 1996).

FIGURA 3: Representação esquemática do sistema de expressão e endereçamento proteico desenvolvido por Dieye *et al.*, 2001.

FIGURA 4: Resposta imune protetora contra a *Brucella abortus*.

FIGURA 5: Estrutura secundária do dímero da proteína L7/L12.

FIGURA 6: Estruturas esquemáticas da unidade transcricional para produção e exportação de L7/L12.

FIGURA 7: Estrutura tridimensional da proteína GroEL e os complexos distintos formados por GroEL e GroES.

FIGURA 8: Esquema do protocolo de preparação das linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras do antígeno L7/L12 para as imunizações.

FIGURA 9: Cronograma das imunizações e provas de proteção utilizando linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras de L7/L12.

FIGURA 10: Representação esquemática da detecção de anticorpos L7/L12-específicos nas fezes e no soro.

FIGURA 11: Determinação do nível de imunoproteção.

FIGURA 12: Análise da produção da proteína L7/L12 nas linhagens recombinantes de *L. lactis* através da técnica de "western blot".

FIGURA 13. Curvas de crescimento das linhagens recombinantes de *L. lactis*.

FIGURA 14: Análise da resposta humoral de mucosa após dosagem de IgA anti-L7/L12 nas fezes dos camundongos BALB/c vacinados pela via intragástrica com linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras da proteína L7/L12 da *B. abortus*.

FIGURA 15: Detecção de IgG anti-L7/L12 nos camundongos vacinados com a linhagem vacinal S19 da *B. abortus*.

FIGURA 16: Análise da resposta humoral de mucosa após análise de IgA anti-L7/L12 nas fezes dos camundongos imunizados com a linhagem recombinante de *L. lactis* produtora da proteína L7/L12 da *B. abortus* no citoplasma, associada ou não a adjuvantes de mucosa.

FIGURA 17: Análise do produto da amplificação por PCR do gene *GroEL* da *B. abortus*.

FIGURA 18. Análise dos perfis de digestão dos clones obtidos após a transformação em *L. lactis*.

FIGURA 19: Esquema das unidades transcricionais para produção da proteína GroEL da *B. abortus* nas linhagens recombinantes de *L. lactis*.

FIGURA 20: Análise da produção da proteína GroEL da *B. abortus* em linhagens recombinantes de *L. lactis* através do “western blot”.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Proteínas heterólogas produzidas em *L. lactis*.

TABELA 2: Características de sistemas de expressão induzidos em BAL.

TABELA 3: Vantagens associadas com a administração de vacinas de mucosas.

TABELA 4: Estratégias utilizadas para administrar vacinas de mucosas.

TABELA 5: Linhagens bacterianas.

TABELA 6: Plasmídeos bacterianos.

TABELA 7: Estudos utilizando as BAL como vacinas vivas.

TABELA 8: Nível de proteção induzida pela imunização com a linhagem recombinante de *L. lactis* pCYT:L7/L12 sozinha ou associada com LBH163 ou *Lb. delbrueckii*.

RESUMO

A *Brucella abortus* é o agente etiológico da brucelose, uma zoonose que afeta gravemente homens e animais domésticos. Atualmente não existe uma vacina para o controle da brucelose humana, e as vacinas empregadas no controle da brucelose animal não são totalmente eficazes. Portanto, o desenvolvimento de vacinas mais efetivas e seguras constitui uma prioridade para o controle dessa doença. Neste trabalho, foram testadas como vacinas vivas, linhagens recombinantes de *Lactococcus lactis* produtoras do antígeno ribossomal L7/L12 da *Brucella abortus* em três compartimentos celulares diferentes: citoplasma, meio extracelular e a parede celular, administradas pela via intragástrica em camundongos BALB/c. Níveis significativos de imunoglobulinas-A anti-L7/L12 foram observados na vacinação destes animais com a linhagem de *L. lactis* que expressa a proteína L7/L12 no citoplasma (pCYT:L7/L12) sozinha ou associada as linhagens que foram utilizadas como adjuvantes de mucosa, *L. lactis* produtora da interleucina-12 ou *Lactobacillus delbrueckii*, além de conferirem proteção parcial contra a brucelose experimental. No entanto, esses adjuvantes não foram capazes de potencializarem a resposta imune protetora induzida pela linhagem pCYT:L7/L12. Paralelamente, também foram construídas linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras da proteína imunogênica de choque térmico GroEL da *B. abortus*. O gene *GroEL* foi amplificado, clonado em *L. lactis* sob o controle do promotor induzido por nisina, P_{nisA} (Sistema NICE) e endereçado para dois compartimentos celulares diferentes (citoplasma e meio extracelular). Através da técnica de "western blot", verificou-se que não ocorreu produção citoplasmática dessa proteína e as linhagens que deveriam secretá-la, permaneceram com a mesma retida no citoplasma na sua forma precursora.

ABSTRACT

The Gram-negative bacterium, *Brucella abortus*, is a facultative intracellular pathogen and the causative agent of brucellosis, a worldwide zoonosis. Presently, there is no vaccine for human brucellosis control and the current vaccines for animal brucellosis are far from ideal. Therefore, the development of more effective and safer vaccines is an important step for brucellosis control. In this work, recombinant strains of *Lactococcus lactis* producing L7/L12 of *B. abortus* addressed to three different locations: cytoplasmic, cell wall-anchored and secreted, were tested as live vaccines and administered by intragastric route. Significant levels of anti-L7/L12 specific immunoglobulins A were detected in mice vaccinated with the strain producing the cytoplasmic L7/L12 (pCYT L7/L12), either alone or associated with the following bacterial strains used as adjuvants: a recombinant strain of *L. lactis* producing interleukin-12 or a *Lactobacillus delbrueckii* strain. Mice immunized with these strains elicited a partial protective immunity against experimental brucellosis. However, these adjuvants were not able to increase the protective immune response elicited by pCYT:L7/L12 strain. We also constructed recombinant strains of *L. lactis* producing the protein GroEL, used as an immunogen,. The *GroEl* gene was cloned in *L. lactis* under the control of a nisin-induced promoter P_{nlsA} (NICE system) and was addressed to two different locations (cytoplasmic and secreted). Analysis by western blot showed that the GroEL protein was not produced by cytoplasmic form, but can be produced by secreted forms. However, the protein was only produced in cytoplasm and could not be secreted.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO

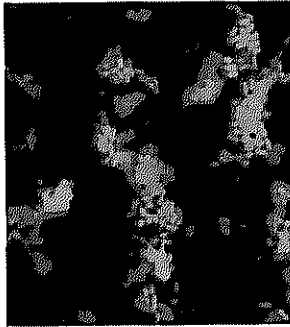
A vacinação é o processo mais efetivo na profilaxia de doenças infecciosas, que foram as responsáveis pelas grandes epidemias da história da humanidade. A vacina ideal deve ser biologicamente estável, não apresentar risco de reversão da virulência *in vivo* e *in vitro*, deve induzir imunidade de mucosa, humoral e celular e ser facilmente produzida em grande escala (Babiuk, 1999; Ellis, 2001). Enquadrando-se neste contexto, provavelmente, as vacinas do futuro terão como alvo a imunidade de mucosa. Vários estudos foram e vêm sendo realizados, no desenvolvimento de vacinas, utilizando vetores vivos capazes de apresentar antígenos na superfície das mucosas, a principal via de entrada da maioria dos patógenos no hospedeiro (Cripps *et al.*, 2001; Medina & Guzmán, 2001).

A brucelose, causada pela espécie *Brucella abortus*, é uma zoonose responsável por prejuízos e grandes perdas sócio-econômicas, afetando gravemente o homem e os animais domésticos. Apesar de existirem vacinas disponíveis contra essa enfermidade, como a S19 e a RB51, seus níveis de proteção não são totalmente eficazes, visto que uma fração do rebanho vacinado permanece susceptível às linhagens virulentas do campo, além dessas serem patogênicas aos seres humanos (Cotton *et al.*, 1933; Spink & Thompson, 1953; Morbidity and Mortality Weekly Report, 1998). Dessa forma, ainda é necessário o desenvolvimento de uma vacina realmente eficaz para a significativa diminuição, ou mesmo erradicação da brucelose (Freney *et al.*, 2000).

Dentro desse contexto, este estudo teve como objetivo a implantação de uma nova estratégia de vacinação oral contra a brucelose experimental, utilizando como sistema de expressão e apresentação de antígenos heterólogos, o *Lactococcus lactis* que

é a bactéria do ácido láctico (BAL) modelo (a mais bem caracterizada das BL e que possui o maior número de instrumentos genéticos), não patogênica e inócua. A sua utilização na estratégia de vacinação oral é bastante interessante uma vez que a mucosa, como no caso da *B. abortus*, constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos.

Este trabalho de dissertação de mestrado é um dos sub-projetos do projeto CAPES/COFECUB 319-II, que têm como objetivo a construção de linhagens de bactérias do ácido láctico produtoras de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico. Tal projeto é fruto da colaboração internacional Brasil e França e aprovado pela FAPEMIG e CNPq. Essa colaboração envolve os Laboratórios de Genética Celular e Molecular (LGCM), de Imunologia de Doenças Infecciosas (LIDI) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e o de Pesquisa Leiteira Aplicada (URLGA) do Instituto Nacional de Pesquisa Agrônômica (INRA) em Jouy-en- Josas, França.



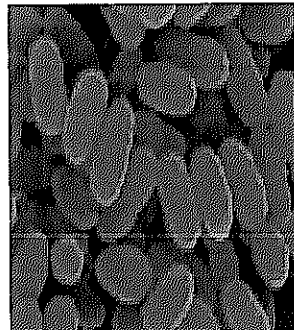
Lactococcus sp.



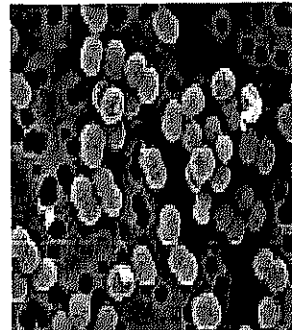
Lactobacillus sp.



Leuconostoc sp.



Streptococcus sp.



Pediococcus sp.

FIGURA 1: Fotos de cinco gêneros bacterianos que compõe o grupo das bactérias lácticas (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Pediococcus*).

REVISÃO DA LITERATURA

1. As bactérias do ácido láctico

1.1. Características gerais

As bactérias do ácido láctico (BAL) são cocos ou bacilos Gram-positivos que constituem um grupo de microrganismos bastante heterogêneo encontrado em diferentes nichos ecológicos como laticínios, vegetais, carnes e nas superfícies da mucosa humana ou animal (Stackerbrandt & Teuber, 1988). Essas bactérias são anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, imóveis, possuem habilidade de crescer em baixo pH, requerem diferentes nutrientes para seu crescimento (carboidratos, aminoácidos e vitaminas), são catalase negativas e têm como principal função a conversão de açúcares em ácido láctico (Kandler, 1983; Stackerbrandt & Teuber, 1988). As espécies de bactérias em questão pertencem aos gêneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, entre outros (FIG. 1) (Stiles & Holzappel, 1997).

É interessante notar que, dentro de um mesmo gênero, existem linhagens não patogênicas e patogênicas. Por exemplo, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* são usadas na produção de iogurte e queijo e *Streptococcus pneumoniae* e *Lactococcus garviae* são agentes da pneumonia e da mastite, respectivamente. Dessa forma, apenas as BAL não patogênicas são inócuas e consideradas "GRAS" (Generally

Regarded As Safe) e tornam-se interessantes como agentes bioterapêuticos (Aguirre & Collins, 1993).

As BAL são utilizadas no processo fermentativo, na agricultura, nos alimentos e, recentemente, na medicina, tornando-se objetos de inúmeras pesquisas para a produção de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico e de aplicações comerciais. Contribuindo com estes avanços, as sequências genômicas de algumas BAL foram determinadas e mais de vinte estão em andamento (Klaenhammer *et al.*, 2002). Essas informações, que já encontram disponíveis, são de grande importância para as futuras manipulações genéticas dessas bactérias.

1.1.1. *Lactococcus lactis*: a bactéria do ácido láctico modelo

A utilização de *L. lactis* na indústria de laticínios é de grande relevância (Duwat *et al.*, 2000). Além da sua importância econômica, essa bactéria não comensal e não invasiva tornou-se modelo das BAL pela facilidade de se manipulá-la, o que permitiu o seu estudo e o desenvolvimento de eficientes instrumentos genéticos como plasmídios, transposons, promotores para regulação da expressão gênica, genes repórteres e linhagens supressoras. Recentemente, essa bactéria teve seu genoma completamente sequenciado (de Vos & Simons, 1994; Duwat *et al.*, 2000; Bolotin *et al.*, 2001).

1.2. As bactérias do ácido láctico na indústria agro-alimentar

A fermentação láctica realizada pelas BAL que convertem os açúcares do meio em ácido láctico é uma das formas mais antigas de conservação de produtos oriundos da

agricultura ou da indústria agro-alimentar. Esse tipo de fermentação está relacionado, em primeiro lugar, com produtos lácteos (iogurte, queijos, manteiga, creme) e, também, com carnes, frios, pão de levedo, chá, cidra, cerveja e vinho (Tailliez, 2001). A acidificação desses produtos em um pH próximo de quatro e a produção de bacteriocinas e ácidos orgânicos, majoritariamente ácidos lácticos, impedem o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Isso permite que o tempo de conservação dos produtos fermentados seja muito maior que o dos produtos em que a matéria prima não seja fermentada (Jack *et al.*, 1995; Brassart & Schiffrin, 1997; van de Guchte *et al.*, 2001).

Outro papel realizado pelas BAL é o desenvolvimento de propriedades organolépticas de alimentos fermentados. Por meio da produção de um grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, as BAL transformam os nutrientes fundamentais dos produtos agrícolas em compostos com propriedades organolépticas complexas. Essas atividades bioquímicas permitem às BAL modificar, pouco a pouco, a estrutura e o aroma dos alimentos fermentados e contribuir para o desenvolvimento das suas qualidades organolépticas (Schleifer & Kilpper-Galz, 1987).

Dessa forma, as BAL possuem uma importância econômica reconhecida pelas indústrias agro-alimentares de todo o mundo, pois promovem a preservação dos alimentos e determinam o sabor, textura e valor nutricional dos mesmos (Daly *et al.*, 1996). Os produtos fermentados representam, aproximadamente, 20% do valor econômico mundial total gerado pela sua comercialização. Entre os maiores produtores mundiais desses produtos, os Estados Unidos estão em primeiro lugar, seguido pela França e Holanda. No Brasil, o mercado de produtos lácteos chegou a movimentar cerca de 11,86 bilhões de reais em 1999 (Martins & Gomes, 2000).

1.3. Atividades probióticas das bactérias do ácido láctico

Além das funções de ordem biotecnológica, também é atribuída as BAL a capacidade de promoverem efeitos benéficos para a saúde, ou “probióticos”, quando são ingeridas vivas e interagem com a microbiota digestiva humana e animal (Fuller, 1989; Holzapfel & Schillinger, 2002). Por exemplo, animais de criação cuja alimentação foi suplementada com certas bactérias que agem no aumento da taxa de crescimento desses animais. Essa noção já havia sido suscitada por Metchnikof, em 1908. Entretanto ela somente despertou maior interesse, recentemente, e se insere no quadro comportamental dos consumidores em busca de uma alimentação benéfica à saúde. Atualmente, a indústria agroalimentar já comercializa probióticos baseados em produtos lácteos fermentados, como leite acidófilo e iogurtes (Holzapfel & Schillinger, 2002).

Três tipos de atividades probióticas foram estabelecidos cientificamente. O primeiro é relacionado à digestibilidade da lactose. Esse açúcar, presente em abundância nos produtos lácteos, pode induzir fenômeno de intolerância nos consumidores que possuam deficiência congênita em lactase, enzima responsável pela sua degradação (O’Sullivan, 1992; Salminen *et al.*, 1993). O quadro clínico pode ser traduzido por diarreias, cólicas abdominais ou flatulência (Roberfroid, 2000). Curiosamente, esses sintomas aparecem quando a lactose é absorvida do leite, mas são ausentes quando absorvidas do iogurte nas mesmas proporções. Existem duas possíveis explicações para o fenômeno: (i) a flora bacteriana do iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) suplementaria a deficiência em lactase do hospedeiro com a sua; (ii) e estimularia, na mucosa intestinal do hospedeiro a produção endógena da lactase (Marteau & Rambaud, 1993; O’Sullivan, 1992).

Uma outra atividade probiótica exercida pelas BAL é a higienização do tubo digestivo, que hospeda uma flora microbiana abundante, da qual as bactérias do ácido láctico fazem parte. Essas bactérias, devido aos produtos de seu metabolismo, modulam a microbiota nos locais onde estão presentes. Essa microbiota desejável protege e proporciona benefícios à saúde do hospedeiro, impedindo o crescimento de microrganismos patogênicos e impedindo a reabsorção de compostos aminados indesejáveis, desconjugando ácidos biliares, biodisponibilizando minerais como cálcio e ferro e, por meio de suas enzimas, favorecendo o metabolismo de algumas substâncias como a lactose, em indivíduos lactase não persistentes (Ferreira & Teshima, 2000; Holzapfel & Schillinger, 2002). As BAL servem também como suplementos microbianos vivos que, ingeridos, melhoram o balanço microbiano do hospedeiro. Assim, a flora endógena de seu hospedeiro, além de manter o equilíbrio do trato gastrointestinal e estimular respostas imunológicas, ainda tem a função de formar uma barreira protetora ao ocupar os nichos em que os patógenos podem se estabelecer (Salminen *et al.*, 1993; Brassart & Schiffrin, 1997).

Portanto, está bem estabelecido que certas linhagens de BAL possuem atividades adjuvantes que estimulam uma resposta imune do hospedeiro contra antígenos. Entre os lactobacilos, o *Lactobacillus casei* mostrou-se capaz de estimular a resposta imunitária de crianças quando vacinadas por via oral contra o rotavírus, vírus responsável pela diarreia aguda infantil nos países em desenvolvimento (Isolauri *et al.*, 1995). Os *Lactobacillus acidophilus* são habitantes normais do intestino do hospedeiro, resistem às condições adversas do trato gastrointestinal e também podem induzir citocinas do tipo I que estimulam a resposta inata do hospedeiro frente a patógenos (Neumann *et al.*, 1998).

TABELA 1: Proteínas heterólogas produzidas em *L. lactis*

Proteínas	Gene	Origem	Secretada / Ancorada	Referência
Repórter				
Nuc	<i>nuc</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	secretada	Le Loir <i>et al.</i> , 1994
β -lactamase	<i>bla</i>	<i>Escherichia coli</i>	secretada	Sibakov <i>et al.</i> , 1991
β -galactosidase	<i>lacZ</i>			
β -galactosidase	<i>lacZ</i>			Israelsen <i>et al.</i> , 1995
α -amilase	<i>amyS</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	secretada	Van Asseldonk <i>et al.</i> , 1993 Le Loir <i>et al.</i> , 1998
α -amilase	<i>amyL</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	secretada	Perez-Martinez <i>et al.</i> , 1992
M6	<i>m6</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ancorada	Piard <i>et al.</i> , 1997
Green fluorescent protein	<i>gfp</i>		citoplasmática	Geoffroy <i>et al.</i> , 2000
luciferase	<i>luxAB</i>	<i>Vibrio harveyi</i>		Corthier <i>et al.</i> , 1998
luciferase	<i>Vflux</i>	<i>Vibrio fischeri</i>		Waterfield <i>et al.</i> , 1995
Estreptavidina	<i>SA</i>	<i>Streptomyces avidinii</i>	ancorada	Steidler <i>et al.</i> , 1998
β -glucuronidase	<i>gus</i>	<i>Escherichia coli</i>	citoplasmática	Thompson and Gasson, 2001
Antígenos bacterianos				
L7/L12	<i>L7/L12</i>	<i>Brucella abortus</i>	secretada / ancorada	Ribeiro <i>et al.</i> , 2002
TTFC	<i>ttfc</i>	<i>Clostridium tetani</i>	secretada	Wells <i>et al.</i> , 1993
Antígeno virais				
E7	<i>E7</i>	HPV tipo 16	secretada	Bermudez <i>et al.</i> , 2002
NSP4	<i>NSP4</i>	Coronavirus bovino	citoplasmática	Enouf <i>et al.</i> , 2001
Epítipo BCV	<i>BCV</i>	Coronavirus bovino	secretada	Langella and Le Loir, 1999
Urease subunidade B	<i>UreB</i>	<i>Helicobacter pilori</i>	secretada	Lee <i>et al.</i> , 2001
Interleucinas				
IL-2	<i>IL-2</i>	Camundongo	secretada	Steidler <i>et al.</i> , 1995
IL-6	<i>IL-6</i>	Camundongo	secretada	Steidler <i>et al.</i> , 1998
IL-10	<i>IL-10</i>	Camundongo	secretada	Schotte <i>et al.</i> , 2000
IL-12	<i>IL-12</i>	Camundongo	secretada	Bermudez <i>et al.</i> , submitted
Alérgenos				
BLG	<i>blg</i>	Humano	citoplasmática / secretada	Bernasconi <i>et al.</i> , 2002 ; Chatel <i>et al.</i> , 2001
Fatores de virulência				
Fibronectina ligada a proteína A	<i>fnbpA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		Sinha <i>et al.</i> , 2000
Clumping factor	<i>clfA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		Que <i>et al.</i> , 2000
Proteína A	<i>spa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ancorada	Steidler <i>et al.</i> , 1998
Enzimas				
Enzima lítica de bacteriófago	<i>Ply</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> bacteriófago	secretada	Gaeng <i>et al.</i> , 2000
Lisozima		Ovo de galinha	não	Van de Guchte <i>et al.</i> , 1989
Protease neutra	<i>npr</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	sim	Van de Guchte <i>et al.</i> , 1990
Estreptodornase		<i>Streptococcus equisimilis</i>	secretada	Wolinowska <i>et al.</i> , 1991
Lipase	<i>lip</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>	secretada	Drouault <i>et al.</i> , 2000
Plasmina		Bovino	secretada	Arnau <i>et al.</i> , 1997

Outras atividades probióticas para as BAL foram propostas e as mais interessantes são as atividades anticolesterolêmicas e antitumorais. No entanto, mais experimentos são ainda necessários para demonstrar que as BAL exercem, de fato, essas atividades *in vivo* (Marteau & Rambaud, 1993).

1.4. Novas utilizações terapêuticas e tecnológicas das bactérias do ácido láctico

A partir do começo dos anos 90, surgiram novas idéias de utilização das BAL como a produção de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico e farmacêutico nesses microrganismos. Dessa forma, vários laboratórios, há alguns anos, vêm tentando superproduzir nas BAL, moléculas com diversas atividades biológicas (TAB. 1). Essa perspectiva começou lentamente a se tornar realidade devido aos conhecimentos acumulados nos últimos 20 anos sobre a fisiologia, bioquímica e genética das BAL e ao desenvolvimento de várias ferramentas genéticas como plasmídios, transposons, sistemas de expressão indutíveis, etc (de Vos & Simons, 1994; Corthier *et al.*, 1997; Mercenier, 1999; Geoffroy *et al.*, 2000; Dieye *et al.*, 2001; Le Loir *et al.*, 2001). Além disso, as seqüências genômicas de diversas espécies de BAL foram determinadas. Pelas razões anteriormente citadas, vários estudos vêm investigando o potencial de utilização dessas bactérias na produção de proteínas heterólogas em produtos alimentícios ou no trato digestivo de humanos e animais (Wells *et al.*, 1995; Chatel *et al.*, 2001; Enouf *et al.*, 2001).

Uma nova aplicação na utilização das BAL é a produção de proteínas de interesse médico ou farmacêutico, como a produção de enzimas para suplementação de

deficiências pancreáticas ou vitamínicas, visando a melhora da saúde do hospedeiro, oferecendo-lhe melhor conforto intestinal (Drouault *et al.*, 2000; 2002).

Outra perspectiva particularmente atraente é a utilização das BAL como usinas celulares para produção e apresentação de antígenos, devido essas serem consideradas “GRAS” e algumas espécies possuem a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal ou a mucosa genital de certos animais e do homem. Dessa forma, essas bactérias tornaram-se excelentes candidatas a vacinas orais (Dougan, 1994; Mercenier *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1997; Corthier *et al.*, 1998; Mercenier, 1999).

Enfim, para que essas novas utilizações das BAL se tornem realidade, vários estudos vêm sendo realizados, utilizando, principalmente, *Lactobacillus* sp. e *Lactococcus* sp. como microrganismos modelos. Foram desenvolvidos sistemas altamente ativos, para que um determinado antígeno possa expressar sua capacidade imunogênica, quando apresentado ao sistema imune de mucosa (Wells *et al.*, 1993a; Collingwood *et al.*, 1995; Norton *et al.*, 1995; de Vos, 1999; Kuipers *et al.*, 2000; Le Loir *et al.*, 2001)

2. Sistemas de expressão e endereçamento celular de proteínas heterólogas em *L. lactis*

2.1. Expressão de proteínas heterólogas em *L. lactis*

Níveis elevados e controlados de produção de proteínas heterólogas em *L. lactis* foram obtidos com o desenvolvimento de vetores, contendo promotores constitutivos ou indutivos que hoje constituem a base de todos os sistemas de expressão para *L. lactis* e

outras BAL (Kuipers *et al.*, 1997; de Vos, 1999). A expressão constitutiva é altamente interessante, pois não necessita de indutor para ativação do promotor, e a expressão gênica ocorre constantemente, promovendo a síntese da proteína de interesse. Um grupo de 38 promotores que diferem na sua força de expressão, incluindo promotores fortes, como o P₅₉, foram analisados e classificados como sendo constitutivos (de Vos, 1999). Contudo, a produção contínua de certas proteínas pode gerar para o microrganismo um estresse fisiológico que prejudicaria o seu crescimento e causaria complicações na expressão do gene de interesse, podendo ainda tornar-se tóxica para o mesmo (Chamberlain *et al.*, 1997). Nesses casos, sistemas de expressão, contendo promotores que são regulados por indutores, repressores ou fatores ambientais, são essenciais para o controle da expressão gênica, oferecendo ainda algumas vantagens sobre os sistemas constitutivos, como a capacidade de controlar o nível de produção e modular a expressão da proteína. Os sistemas de expressão indutíveis são capazes de superproduzir certas proteínas, em um momento desejado, durante o processo da fermentação industrial. Além disso, proteínas deletérias para a célula, podem ser produzidas a partir do meio de cultivo na fase exponencial de crescimento da bactéria ou na fase estacionária, em que as células são mais resistentes. Atualmente, existem sistemas de expressão indutíveis bem desenvolvidos em *L. lactis*, como os induzidos por: nisina, lactose, temperatura, pH e outros (TAB. 2) (Wells *et al.*, 1993a; Kuipers *et al.*, 1997; de Vos, 1999). O sistema de expressão induzido por nisina, também conhecido como sistema NICE, é muito bem caracterizado e é o mais utilizado nas BAL (de Vos & Gasson, 1989; Wells *et al.*, 1993a; de Vos, 1999).

TABELA 2: Características de sistemas de expressão induzidos em BL

BL	Promotores/ Repressores	Fator indutor	Genes expressos
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>lacA</i> ou <i>lacR</i>	Lactose	<i>cat-86, luxAB</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>lacA</i> / T7	Lactose	Gene para TTFC
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>dnaJ</i>	Alta temperatura	<i>amyS</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>sodA</i>	Aeração	<i>lacZ</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>prtP</i> ou <i>prtM</i>	Ausência de peptídeos	<i>gusA</i>
<i>L. lactis</i>	Repressor/ operador ϕ rlt	Mitomicina C	<i>lacZ</i>
<i>Lb. pentosus</i>	Promotor <i>xylA</i>	Xilose	<i>cat-86</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor PA170	Baixo pH, baixa temperatura	<i>lacZ</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>trpE</i>	Ausência de triptofano	<i>lacZ</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor ϕ 31 e <i>ori</i>	Infecção pelo ϕ 31	<i>lacZ</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>nisA</i> ou <i>nisF</i>	Nisina	<i>gusA, pepN, lytHA, nox. EstA, ptsH, pepO, ccpA</i>

FONTE: Kuipers *et al*, 1997

outras BAL (Kuipers *et al.*, 1997; de Vos, 1999). A expressão constitutiva é altamente interessante, pois não necessita de indutor para ativação do promotor, e a expressão gênica ocorre constantemente, promovendo a síntese da proteína de interesse. Um grupo de 38 promotores que diferem na sua força de expressão, incluindo promotores fortes, como o P₅₉, foram analisados e classificados como sendo constitutivos (de Vos, 1999). Contudo, a produção contínua de certas proteínas pode gerar para o microrganismo um estresse fisiológico que prejudicaria o seu crescimento e causaria complicações na expressão do gene de interesse, podendo ainda tornar-se tóxica para o mesmo (Chamberlain *et al.*, 1997). Nesses casos, sistemas de expressão, contendo promotores que são regulados por indutores, repressores ou fatores ambientais, são essenciais para o controle da expressão gênica, oferecendo ainda algumas vantagens sobre os sistemas constitutivos, como a capacidade de controlar o nível de produção e modular a expressão da proteína. Os sistemas de expressão indutíveis são capazes de superproduzir certas proteínas, em um momento desejado, durante o processo da fermentação industrial. Além disso, proteínas deletérias para a célula, podem ser produzidas a partir do meio de cultivo na fase exponencial de crescimento da bactéria ou na fase estacionária, em que as células são mais resistentes. Atualmente, existem sistemas de expressão indutíveis bem desenvolvidos em *L. lactis*, como os induzidos por: nisina, lactose, temperatura, pH e outros (TAB. 2) (Wells *et al.*, 1993a; Kuipers *et al.*, 1997; de Vos, 1999). O sistema de expressão induzido por nisina, também conhecido como sistema NICE, é muito bem caracterizado e é o mais utilizado nas BAL (de Vos & Gasson, 1989; Wells *et al.*, 1993a; de Vos, 1999).

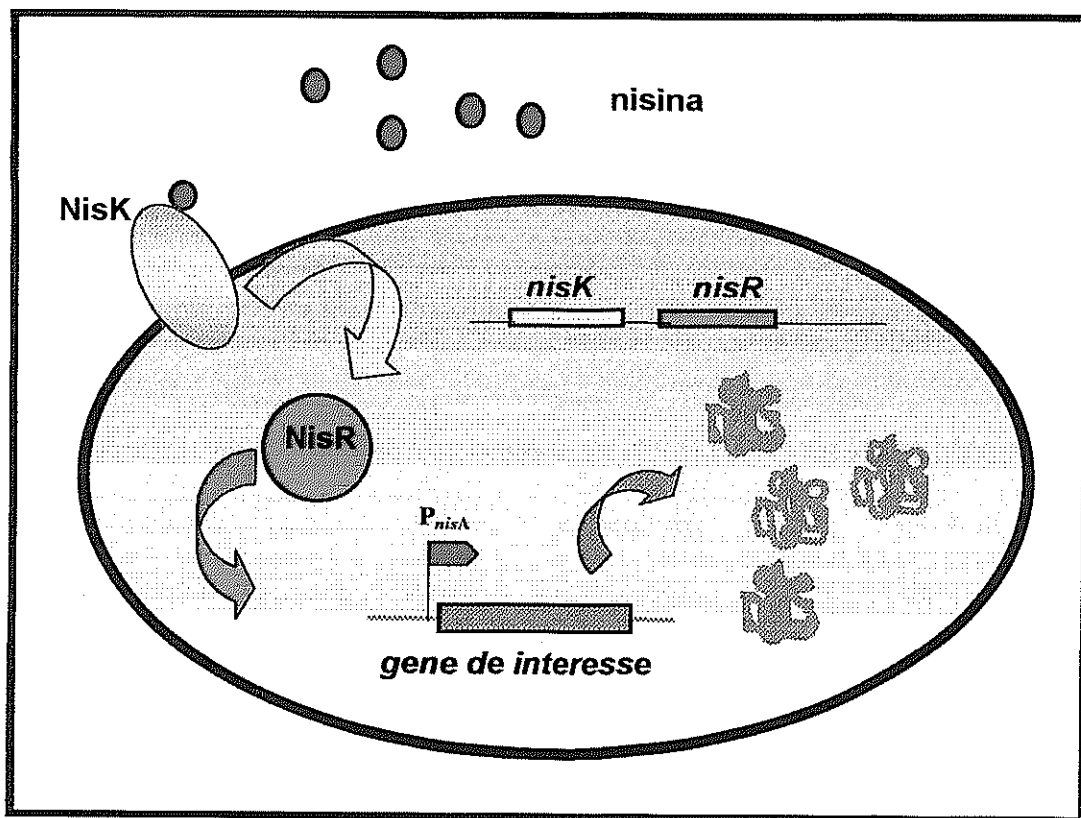


FIGURA 2: O sistema de expressão NICE (de Ruyter *et al.*, 1996). A presença de nisina no meio extra-celular é percebida pela proteína sensora NisK que através de um processo de transdução de sinal, ativa a proteína efetora NisR. Conseqüentemente, a forma ativada de NisR induz a expressão do gene de interesse que está sobre o controle do promotor P_{nisA} , localizado em um vetor.

2.1.1. Sistema de expressão NICE (Nisin Controlled Expression)

O sistema NICE é altamente versátil e fortemente controlado pela nisina. A nisina é um peptídeo antimicrobiano de 34 aminoácidos, catiônico e hidrofóbico, pertencente à classe lantibiótica das bacteriocinas, utilizada como conservante natural de alimentos e é produzida por várias linhagens de *L. lactis* (de Vos, 1999). Esse sistema de expressão, baseado em genes que participam da biossíntese e regulação da nisina (de Ruyter *et al.*, 1996; Kuipers *et al.*, 1998), desenvolvido para o uso nas BAL, é um dos mais poderosos e promissores.

Onze genes (*nisABTCIPRKFEG*) estão envolvidos na produção, modificação e secreção deste peptídeo. O gene *nis A* codifica a nisina A, um peptídeo precursor de 57 resíduos de aminoácidos (Buchman *et al.*, 1988; Kalleta & Entian, 1989), os genes *nisBC* participam das modificações pós-traducionais e o *nisT* do transporte, através da membrana plasmática (Engelke *et al.*, 1992; Kuipers *et al.*, 1993). O gene *nisP* está relacionado com a quebra da nisina (van de Meer *et al.*, 1993) e os genes *nisI* e *nisFEG*, codificam uma lipoproteína que gera imunidade na linhagem produtora contra a nisina (Kuipers *et al.*, 1993; Siegers & Entian, 1995). A biossíntese da nisina está sujeita a auto-regulação e sua função como molécula sinal induz a transcrição de dois genes reguladores do sistema: o gene *nisK* que expressa uma histidina quinase e o gene *nisR* . regulador da resposta (de Vos *et al.*, 1995). Nesse sistema autoregulatório, a histidina quinase capta a presença da nisina no meio e é autofosforilada. O grupo fosfato é então transferido para o regulador da resposta que, por sua vez, ativa o promotor P_{nisA} , e este dá início à transcrição do gene de interesse (FIG. 2) (Chandrapati & O'Sullivan, 1999).

Vários sistemas induzidos pela nisina foram desenvolvidos e a concentração de nisina necessária para indução do sistema é mínima (0,01 – 10 ng/ml) (de Ruyter *et al.*, 1996). Uma variedade de vetores de expressão construídos, contendo o promotor P_{nisA} , seguido de sítios de clonagem múltipla (MCS), para inserção de genes, encontra-se disponível.

2.2. Sistemas de endereçamento celular de proteínas heterólogas em *L. lactis*

Para que as proteínas de interesse (enzimas ou antígenos), produzidas em *L. lactis*, atinjam uma determinada região que facilite seu contato com o respectivo substrato ou alvo é necessário que elas sejam corretamente endereçadas para seu destino celular: citoplasma, parede celular ou meio extracelular. Nos dois últimos casos, o objetivo é que essas proteínas sintetizadas sejam apresentadas no meio externo em sua forma livre (secreção), ou ligadas aos envelopes bacterianos (ancorada). As proteínas recém-sintetizadas devem ser exportadas, ou seja, devem deixar o compartimento citoplasmático e serem dirigidas para a parede celular ou para o meio externo. Essas proteínas estão sujeitas a encontrar vários obstáculos, como proteases, que podem degradá-las ainda no citoplasma. Após essas etapas serem vencidas, a atividade funcional desejada só será obtida se a conformação nativa das moléculas for obtida (Dieye *et al.*, 2001; Fischetti *et al.*, 1993).

O endereçamento celular de proteínas heterólogas deve ser realizado por seqüências ou motivos protéicos. O peptídeo sinal (PS) na porção amino-terminal (N-terminal) das proteínas é um motivo hidrofóbico, pouco conservado, que é reconhecido e clivado pela maquinaria de secreção da célula, possibilitando a translocação da

proteína, através da membrana, para o meio extracelular (Simonen & Palva, 1993). O endereçamento da proteína, para que essa permaneça ancorada à parede celular, exige, além do PS, uma seqüência sinal de ancoramento (CWA; Cell Wall Anchor), localizada na porção carboxi-terminal (C-terminal) da proteína. O CWA apresenta um motivo conservado (LPXTG), de aproximadamente 30 aminoácidos, capaz de ser reconhecido pela maquinaria de ancoramento. Ao ser translocada para fora da célula, a proteína fica presa covalentemente ao peptidoglicano pelo motivo LPXTG (Ton-That *et al.*, 1999).

Estudos para a identificação e a utilização de motivos e de compreensão de como funcionam os mecanismos de secreção e exportação de proteínas heterólogas nas BAL e, especialmente em *L. lactis*, foram realizados (Le Loir *et al.*, 1994; Piard *et al.*, 1997; Le Loir *et al.*, 1998; Langella & Le Loir, 1999). Um dos primeiros sistemas de expressão e endereçamento de proteínas, construídos em *L. lactis*, foi baseado no sistema T7 RNA polimerase, em que o promotor T7 foi fusionado ao peptídeo sinal da proteína Usp45 (PS_{Usp45}), visto que em *L. lactis* poucas proteínas são secretadas e apenas a proteína Usp45, de função desconhecida, é secretada em quantidade detectável em géis de proteína corado com Coomassie (van Asseldonk *et al.*, 1990). Em seguida ao PS_{Usp45}, foi colocado o gene que codifica o fragmento C da toxina tetânica (TTFC). A proteína foi expressa em quantidades abundantes e secretada com eficiência (van Asseldonk *et al.*, 1990; Wells *et al.*, 1993 a, b).

Outro sistema de produção de proteínas, utilizado em *L. lactis*, foi desenvolvido com base na proteína M6 de *Streptococcus pyogenes* (Piard *et al.*, 1997) e Nuc, uma nuclease de *Staphylococcus aureus* (Shortle, 1983). A M6 é uma proteína fibrilar de superfície associada ao envelope celular, considerada modelo de ancoramento (Piard *et al.*, 1997). O Nuc é uma proteína repórter, secretada, bem caracterizada e o seu gene *nuc*

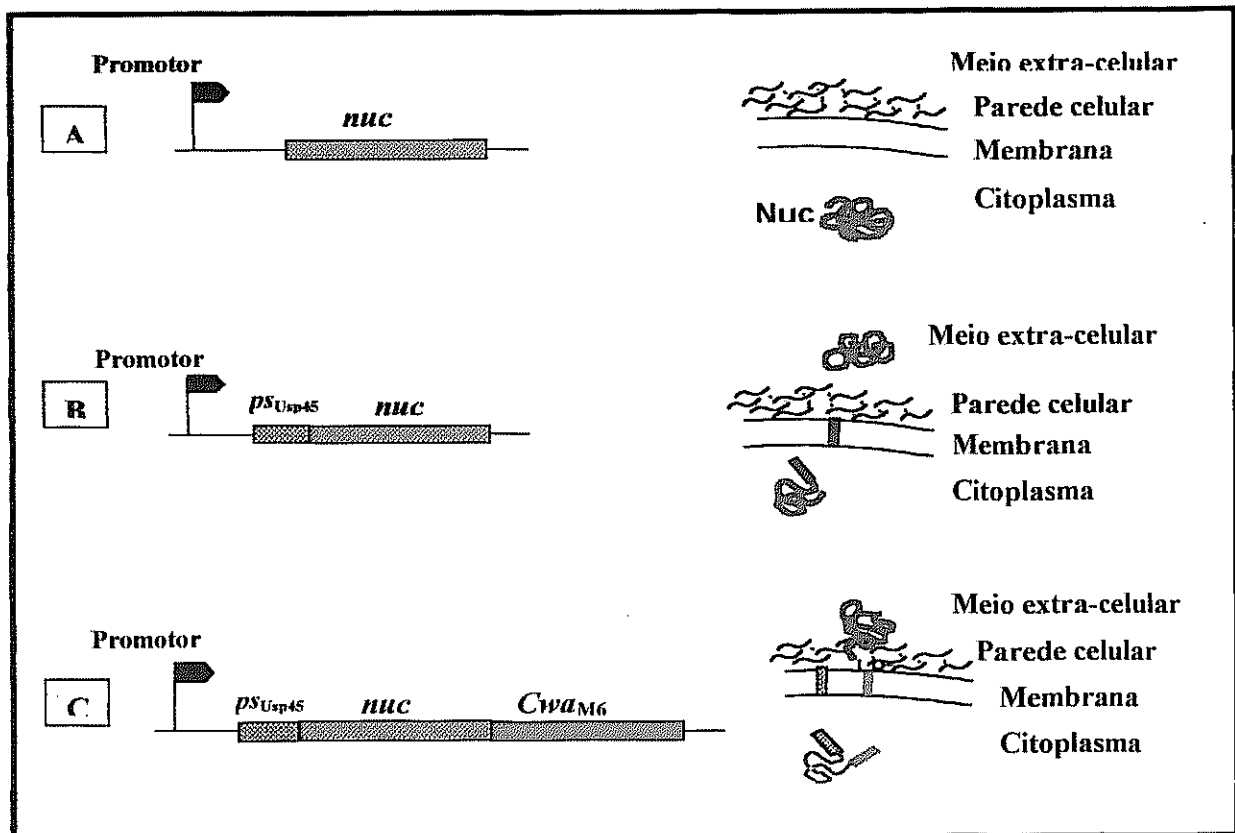


FIGURA 3: Representação esquemática do sistema de expressão e endereçamento proteico desenvolvido por Dieye *et al*, 2001. (A) Localização citoplasmática de Nuc. A ausência de qualquer sinal de endereçamento protéico fusionado ao gene *nuc* (barra vermelha) resulta na localização citoplasmática da proteína (à direita). (B) Localização extra-celular de Nuc. A presença da sequência codificadora do peptídeo sinal de Usp45 (*ps_{Usp45}*/barra azul) endereça Nuc para o meio extra-celular (à direita). (C) Nuc ancorada à célula. A fusão da sequência codificadora do peptídeo sinal *PS_{Usp45}* da sequência codificadora do motivo de ancoragem *cwa_{M6}* (barra verde) faz com que a proteína permaneça ancorada à parede celular (à direita).

FONTE: adaptada de Dieye *et al.*, 2001.

já foi expresso em *Escherichia coli*, em diversas bactérias Gram-positivas e em várias espécies de BAL. Sua atividade é facilmente detectável em colônias bacterianas e em meio líquido através de colorimetria ou espectrofotometria. A sua comercialização facilita a sua quantificação (Poquet *et al.*, 1998; Dieye *et al.*, 2001; Le Loir *et al.*, 2001). Esse sistema de expressão e endereçamento da proteína repórter utiliza o promotor constitutivo P₅₉, o PS_{Usp45} e o motivo de ancoramento CWA da proteína M6, permitindo que a proteína Nuc seja direcionada para três localizações celulares possíveis: citoplasma, parede celular e meio extracelular (FIG. 3). Os resultados obtidos por esse sistema, mostraram que essa proteína, ao atingir seu destino final, mantinha sua atividade biológica (Dieye *et al.*, 2001).

Um terceiro sistema, para melhorar e aumentar a eficiência de secreção de proteínas heterólogas em *L. lactis*, foi desenvolvido por Le Loir e colaboradores (2001). Anteriormente, havia sido mostrado que a carga da extremidade N-terminal do peptídeo maduro de Nuc modificada fusionada ao pro-peptídeo sintético de nove aminoácidos, denominado LEISSTCDA (LEISS), aumentava significativamente a eficiência de secreção dessa proteína em *L. lactis* (Le Loir *et al.*, 1998). Esse pro-peptídeo foi testado na secreção de outras proteínas heterólogas sendo também observado um aumento da eficiência de secreção das mesmas (Piard *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2002 a). Dessa forma, utilizando a proteína repórter Nuc, o primeiro passo foi substituir o PS nativo da proteína pelo PS_{Usp45}, que demonstrou ser capaz de elevar a secreção de Nuc. Em um segundo passo, Nuc foi fusionado ao pro-peptídeo LEISSTCDA e secretado via PS_{Usp}. A combinação do PS_{Usp45} e do pro-peptídeo sintético geraram um aumento significativo na eficiência de secreção e na síntese de Nuc, sendo observada uma secreção quase total da proteína produzida (Le Loir *et al.*, 2001).

TABELA 3: Vantagens associadas com a administração de vacinas de mucosas

Maior segurança
Estimulação de respostas imunes de mucosa e sistêmica
Atingem os sítios de indução da doença
Proteção contra a doença e a infecção
Não provoca contaminação cruzada
Fácil administração
Baixo custo

FONTE: Medina & Guzman, 2001.

TABELA 4: Estratégias utilizadas para administrar vacinas de mucosas

Sistemas de apresentação de antígenos nas mucosas
Vetores vivos virais ou bacterianos
Adjuvantes de mucosas
Partículas virais
Lipossomos
Micropartículas
Plantas transgênicas

FONTE: Medina & Guzman, 2001.

Portanto, os sistemas de expressão e endereçamento fornecem a versatilidade necessária para a produção de antígenos heterólogos em localizações celulares diferentes nas BAL.

3. Das proteínas heterólogas às vacinas vivas de mucosa

Para o desenvolvimento de vacinas vivas de mucosa, objetivando a apresentação de antígenos heterólogos, dois parâmetros devem ser considerados: a escolha da linhagem bacteriana a ser utilizada como vetor e a forma adequada de apresentação do antígeno. A vacina de mucosa ideal deve: promover um contato efetivo entre antígeno e sistema imune, estimular respostas humorais e celulares específicas, produzir uma proteção de longa duração após uma única dose na infância e, ser estável e não tóxica (TAB. 3) (Babiuk., 1999). Diferentes estratégias podem ser utilizadas como vacinas para apresentação de antígenos na superfície de mucosas. Entre elas, a utilização de bactérias como vetores vacinais, constitui a estratégia mais estudada (TAB. 4). O uso de bactérias patogênicas ou não, como vetores vacinais vivos, tem resultado na indução de respostas humorais e celulares efetivas (Ellis, 2001; Medina & Guzmán, 2001).

O uso de patógenos atenuados é particularmente interessante, constituindo um instrumento poderoso para a apresentação de antígenos vacinais, desde que seja simultaneamente alcançada a proteção contra o próprio microrganismo e uma resposta imune específica contra o antígeno heterólogo. A não patogenicidade das linhagens atenuadas está relacionada ao tipo de mutação selecionada que permite a atenuação dos microrganismos (Medina & Guzmán, 2001). A estratégia para a construção desse tipo

de vacina baseia-se na patogênese, imunobiologia e epidemiologia da doença, além das manipulações biotecnológicas disponíveis (Ellis, 2001).

Nos últimos anos, vários mutantes atenuados das bactérias *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Mycobacterium bovis*, *Yersinia enterocolitica* e *Vibrio cholerae* foram gerados e testados como vetores vacinais. Esses estudos trouxeram conhecimento da apresentação e distribuição de antígenos desses sistemas e demonstraram a indução de respostas imunes satisfatórias na prevenção de doenças (Shata *et al.*, 2000; Dietrich *et al.*, 2001; Medina & Guzmán, 2001). Embora as linhagens mutantes sejam estáveis, possuem sérias limitações, pois podem reverter a virulência, sendo seu nível de segurança, então, questionado, especialmente para a utilização em crianças e indivíduos imunocomprometidos. Essas questões de biossegurança devem ser consideradas no desenvolvimento de vacinas mais seguras nos próximos anos (Foss & Murtaugh, 2000).

Pesquisas com vetores bacterianos Gram-positivos são mais recentes e vêm focalizando bactérias como *Bacillus subtilis*, *L. monocytogenes*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Renibacterium salmoninarum*, *Streptococcus gordonii*, *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus*, *Lactobacillus* sp e *L. lactis* (Fischetti *et al.*, 1993; Mercenier *et al.*, 1996; Medaglini *et al.*, 1997; Hodgson *et al.*, 1999; Daly *et al.*, 2001). Entre essas bactérias, as BAL se destacam por possuírem várias propriedades que fazem delas atraentes candidatas a serem utilizadas como vetores vacinais (Pouwels *et al.*, 1998).

3.1. A utilização das bactérias do ácido láctico como vacinas vivas de mucosa

As BAL são amplamente usadas na produção de produtos alimentícios industriais, são organismos “GRAS” e podem ser facilmente administradas pela via oral. Algumas podem apresentar efeitos probióticos, equilibrando a microflora endógena do organismo e antagonizando certos patógenos (Pouwels *et al.*, 1998; Thole *et al.*, 2000). Além disso, o desenvolvimento de vetores de expressão, secreção e ancoramento (Piard *et al.*, 1997; Le Loir *et al.*, 1998, 2001) foram e vêm sendo utilizados na construção de linhagens recombinantes de BAL produtoras de antígenos heterólogos. Essas propriedades suportam a idéia de que estas bactérias podem ser utilizadas como veículos seguros de antígenos protetores nas superfícies das mucosas, objetivando a geração de uma forte resposta imune local, além de uma resposta imune sistêmica. Esse sistema representa uma ótima alternativa diante dos vetores bacterianos atenuados derivados de microrganismos invasivos e patogênicos (Wells *et al.*, 1996; Pouwels *et al.*, 1998; Thole *et al.*, 2000).

Vários trabalhos vêm destacando o potencial das BAL como veículos de produção e apresentação e distribuição de antígenos heterólogos para administração nas mucosas. Foi demonstrada a capacidade de algumas BAL, já testadas como vacinas vivas experimentais, de induzirem uma resposta imune específica em camundongos, através da administração nas mucosas (oral, intranasal, etc), como *S. gordonii* (Pozzi *et al.*, 1992; Medaglini *et al.*, 2001), *Lb. plantarum* (Grangette *et al.*, 2001; Grangette *et al.*, 2002; Reveneau *et al.*, 2002), *Lb. johnsonii* (Scheppeler *et al.*, 2002), *Lb. rhamnosus* (Shu & Gill, 2002) e o *L. lactis* (Wells *et al.*, 1993a; Robinson *et al.*, 1997; Grangette *et al.*, 2002). Esses estudos não notaram nenhuma atividade tóxica ou patogênica e

nenhum efeito prejudicial foi observado em camundongos após a administração oral ou subcutânea dessas bactérias (Wells *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1997; Mercenier, 1999).

Em 1990, Iwaki e colaboradores construíram uma linhagem recombinante de *S. lactis* produtora do antígeno de superfície PAc de *S. mutans* e a utilizaram como vacina oral contra cáries dentárias. Níveis significativos de IgAs na saliva e de IgG no soro foram induzidos nos camundongos imunizados. Mais tarde, foi desenvolvido por Pozzi e colaboradores (1992) um sistema em que a proteína E7 do papilomavírus humano tipo 16 foi fusionada à proteína M6 e integrada ao cromossomo do *S. gordonii*. A bactéria recombinante, expressando na sua superfície a fusão M6-E7, mostrou ser imunogênica em camundongos. Ricci *et al.* (2000) também observaram a indução de uma resposta imune sistêmica e de mucosa, em camundongos BALB/c, quando administrado via subcutânea e intragástrica o *S. gordonii* recombinante, expressando o monômero B da toxina termolábil de *E. coli* (LTB).

Várias espécies de *Lactobacillus* possuem propriedades probióticas e fazem parte da microflora intestinal dos seres humanos. Estudos mostraram que diferentes linhagens dessa bactéria podem provocar diferentes efeitos no sistema imune do hospedeiro, e isto gerou um grande interesse em utilizá-las como vacinas. (Seegers, 2002). A maioria dos trabalhos realizados, utilizando os *Lactobacillus* como potentes vetores para apresentação de antígenos heterólogos, foi obtida com o fragmento C da toxina tetânica (TTFC). O TTFC é um peptídeo antigênico atóxico, bem caracterizado e tornou-se modelo a partir do trabalho bem sucedido realizado por Wells e colaboradores (1993 a). Esse antígeno foi expresso em *L. lactis* e usado na imunização subcutânea de camundongos. Esses animais experimentais foram protegidos contra o desafio letal com

a toxina tetânica. Alguns anos depois, essa proteção também foi observada em camundongos C57BL/6 após a imunização oral desses animais (Robinson *et al.*, 1997). A partir desses resultados positivos obtidos com o *L. lactis*, linhagens recombinantes de *S. gordonni* e *Lactobacillus*, produtoras de TTFC, foram testadas como vacinas. Nesses estudos, algumas variáveis como a linhagem utilizada, níveis de expressão antigênica, localização celular do antígeno e as vias de administração foram analisadas (Seegers, 2002). A resposta imune obtida com *Lb. casei*, expressando o TTFC na superfície da parede celular, quando administrado através da via subcutânea com o adjuvante de Freund, também foi positiva (Maassen *et al.*, 1999). Em 2001, Grangette e colaboradores construíram várias linhagens de *Lb. plantarum*, produzindo o TTFC no citoplasma e em diferentes quantidades e observaram que, após a vacinação intranasal dos animais experimentais, foram induzidas respostas imunes: sistêmica, de mucosa e celular, específicas contra o antígeno. A proteção contra o desafio letal só foi obtida quando os camundongos foram vacinados com a linhagem produtora da maior quantidade de TTFC. Medagliani *et al.* (2001) demonstraram que camundongos vacinados com *S. gordonni*, expressando TTFC na sua superfície celular pela via subcutânea, também foram protegidos contra o tétano. Recentemente, foi realizada a comparação das respostas imunes, induzidas por linhagens recombinantes de *Lb. plantarum*, produtoras do TTFC no citoplasma, no meio extracelular e ancorado à parede celular, administradas por diferentes vias: subcutânea, intranasal e intragástrica. Os resultados mostraram que as três construções eram capazes de induzir uma forte produção de imunoglobulinas G (IgG) antígeno-específicas através das três vias de administração. Observou-se que doses menores da linhagem recombinante, produtora do TTFC ancorado na parede celular, eram necessárias para que fosse imunogênica,

enquanto os maiores níveis de IgG foram obtidos com o *Lb. plantarum* produtor de altos níveis do antígeno no citoplasma (Reveneau *et al.*, 2002). Outras linhagens como o *Lb. johnsonii*, expressando a proteinase ancorada à parede celular, ligada ao peptídeo derivado da toxina tetânica, foi capaz de induzir níveis significativos de IgG e IgA PrtB-específicas (Scheppler *et al.*, 2002).

Crescentes avanços estão sendo feitos no desenvolvimento de instrumentos genéticos adequados para a construção de novas vacinas, utilizando as BAL. Para isso, é de grande importância conhecer mais detalhadamente os mecanismos de resposta imune, modulados pelas BAL.

3.2. As bactérias do ácido lático e o sistema imune de mucosas

A idéia de um sistema imune especializado, associado às mucosas, é relativamente nova. Os epitélios da mucosa são barreiras entre os ambientes interno e externo e constituem, portanto, uma importante primeira linha de defesa do organismo (Salminen *et al.*, 1998).

A entrada de antígenos pelas vias naturais de infecção (oral, respiratória, genital) garantem a exposição do antígeno (vacina) a grandes regiões de tecido, promovendo a ativação desta primeira linha de defesa, que é mediada pela secreção de IgA. A IgA é a principal classe de anticorpos que pode ser eficientemente secretada através dos epitélios, desempenhando papel crítico na defesa contra patógenos, neutralizando a nocividade destes agentes (McGhee *et al.*, 1992; Salminen *et al.*, 1998; Macpherson *et al.*, 2001). O desenvolvimento da produção de anticorpos é feito através da migração

dos linfócitos do tecido linfóide mucoso e do seu envolvimento na resposta imune do epitélio ligado às mucosas (Macpherson *et al.*, 2001; Perdigón *et al.*, 2001).

O intestino é o maior órgão imunológico do corpo, contendo 70 – 80% de toda IgA produzida nas células e excede a produção total de todas as outras classes de imunoglobulinas (Macpherson *et al.*, 2001; Perdigón *et al.*, 2001). O epitélio intestinal funciona como barreira aos antígenos presentes na dieta diária, sendo sua lâmina própria rica em células imunes como linfócitos, células do plasma, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e mastócitos (Perdigón *et al.*, 2001). Os intestinos delgado e grosso apresentam linfonodos. No intestino delgado, eles constituem as Placas de Peyer (PP), ausentes de microvilosidades e onde a produção de muco é reduzida. O peristaltismo intestinal é outro importante mecanismo de defesa da mucosa do hospedeiro para prevenir a colonização do estômago por microrganismos indesejáveis ingeridos com os alimentos (Salminen *et al.*, 1998; Perdigón *et al.*, 2001).

Para alcançar uma resposta imune oral efetiva, é necessária a participação da maioria das células imunes associadas às superfícies da mucosa intestinal: macrófagos, células T regulatórias, linfócitos B e T efetores. Os sítios indutivos de IgA, representado pelas PP, contêm uma região coberta por um único epitélio que contém células especializadas denominadas células M. Essas células têm como função capturar e transportar os antígenos pertencentes ao lúmen intestinal e pequenos parasitas (McGhee *et al.*, 1992; Salminen *et al.*, 1998; Perdigón *et al.*, 2001). Macrófagos e células dendríticas, presentes nos sítios indutíveis de IgA, atuam como células apresentadoras de antígenos e estão envolvidos na regulação das respostas imunes humoral e celular para proteção da mucosa (Perdigón *et al.*, 2001). As células epiteliais comunicam-se com outras células da mucosa por um espectro de mediadores que

desencadeiam uma cascata indutora da liberação de citocinas pelas células imunes associadas a elas, desenvolvendo um papel importante no funcionamento da resposta imune ou na estimulação da resposta imune inflamatória (McGhee *et al.*, 1992; Perdígón *et al.*, 2001)

As BAL fazem parte da microflora natural do trato gastrointestinal de homens e animais e vários fatores mostraram afetar sua prevalência e distribuição no intestino. Em humanos, foi mostrado que a acidez estomacal reduz o trânsito intestinal bacteriano, restringindo a microflora, principalmente no intestino delgado distal, mas depois, vai aumentando ao longo do seu comprimento até o cólon, onde a maior parte da comunidade microbiana desenvolve-se. O papel benéfico desses microrganismos para o homem e outros animais, incluindo seu efeito no sistema imune, vem sendo extensamente relatado (Salminen *et al.*, 1998; Vitini *et al.*, 2000; Perdígón *et al.*, 2001).

A ingestão de BAL é importante para preservação da integridade e estabilização do epitélio e da microflora natural intestinal, que representa uma barreira aos antígenos ou outras substâncias nocivas do lúmen. Essa barreira protege o hospedeiro e determina a função normal do intestino, mas quando perturbada por antígenos, patógenos, substâncias químicas ou radioativas, ela sofre alterações na sua permeabilidade e no processo inflamatório da mucosa (Isolauri *et al.*, 1995). Os antígenos que atravessam esta barreira de defesa são absorvidos através da camada epitelial, podendo sofrer redução da imunogenicidade ou serem transportados e induzirem uma resposta imune. A integridade da barreira de defesa é necessária para prevenir o transporte de antígenos inadequados (Perdígón *et al.*, 2001).

Um antígeno, ao ser administrado via oral, pode induzir uma resposta imune hipo-responsiva. O processo é conhecido como tolerância oral e evita um aumento da

resposta imune inflamatória que pode levar ao aumento da permeabilidade intestinal (Perdigón *et al.*, 2001). As BAL podem induzir uma inflamação local na mucosa intestinal e, como consequência, as funções intestinais sofrem modificações. Por exemplo, pode ser observado um aumento das células do sistema imune e uma translocação da microflora natural. Assim, para o uso bem sucedido das BAL, visando o aumento das funções de secreção do sistema imune, todas as considerações acima devem ser levadas em consideração, principalmente a própria viabilidade das BAL, ou seja, a capacidade de sobreviverem no trato gastrointestinal, sendo essa crítica na determinação da indução da resposta imune por essas bactérias (Perdigón *et al.*, 2001).

Foi observada que as BAL: *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *S. thermophilus*, *Lb. plantarum* e *L. lactis* foram capazes de aumentar a quantidade de IgA, favorecendo uma boa resposta imune da mucosa e que este efeito era dose dependente (Vitini *et al.*, 2000; Perdigón *et al.*, 2001).

4. Adjuvantes de mucosas

Atualmente, uma das contribuições mais importantes para a pesquisa de novas vacinas de mucosas foi a descoberta de adjuvantes capazes de atuarem sobre o sistema imune de mucosas. Os adjuvantes são substâncias que, quando associadas a antígenos protéicos ou de natureza polissacarídea, potencializam a resposta imune, sendo maior do que aquela produzida pelo antígeno administrado isoladamente. Além de estimularem o aumento da imunogenicidade de antígenos, promovem a ativação de diferentes vias do sistema imunológico, como aumento da duração da resposta imune, capacidade de modular a especificidade e a resposta imune, tanto celular como humoral (Foss &

Murtaugh, 2000; Simões & Ferreira, 2001). As vacinas de mucosas diminuem o risco de proliferação de doenças infecciosas, evitando os problemas relacionados à biossegurança das vacinas tradicionais administradas via parenteral, tais como a eliminação de agulhas contaminadas e a utilização de seringas descartáveis. Contudo, as vacinas de mucosas disponíveis são poucas. Nos testes de desenvolvimento deste tipo de vacina, contribuições importantes como a utilização de adjuvantes de mucosa, capazes de induzirem respostas imunes, foram de grande importância (Simões & Ferreira, 2001).

O uso de adjuvantes tornou-se uma ótima alternativa para potencialização do sistema de apresentação de antígenos, gerando altos níveis de anticorpos (Foss & Murtaugh, 2000). Essas moléculas são definidas como imunógenos de mucosa. Toxinas bacterianas secretadas como a toxina colérica de *Vibrio cholerae* (CT) e a enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LT) (Dickinson & Clements, 1995; Koprowski *et al.*, 2000; Pizza *et al.*, 2001) constituem potentes imunógenos e adjuvantes de mucosa, sendo capazes de induzir imunidade protetora, envolvendo tanto resposta imune de mucosa como sistêmica. Contudo essas moléculas são tóxicas e o uso repetido de pequenas quantidades dessas potentes toxinas não seria aceitável para utilização em humanos. Estudos recentes vêm utilizando mutantes genéticos de CT e LT, com a toxicidade reduzida, para avaliarem sua eficácia e segurança (Mrsny *et al.*, 2002). Um adjuvante que se destaca pelo efeito sobre o sistema imune de mucosas é o derivado atóxico da LT, denominado LT_(R192G) produzido por uma linhagem de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) que parece ser particularmente interessante como adjuvante para utilização em humanos, uma vez que é menos tóxica do que CT e LT. A utilização do LT_(R192G) em preparações vacinais contra diferentes patógenos foi capaz de induzir uma resposta humoral sistêmica e de mucosa contra os antígenos co-administrados sem

os efeitos negativos causados por CT e LT (Dickinson & Clements, 1995, 1996; Ricci *et al.*, 2000; Millar *et al.*, 2001; Pizza *et al.*, 2001).

Várias citocinas têm sido administradas como adjuvantes para aumentarem a magnitude da resposta imune com predominância de produção de células T “helper” tipo 1 (Th1) como a interleucina-12 (IL-12) que é uma indutora potencial de interferon- γ (IFN- γ), produzida por células “natural killers” (NK) e células T e que também, são responsáveis pela diferenciação de células T precursoras em células tipo Th1. Como adjuvante de mucosa, a IL-12 demonstrou induzir uma imunidade sistêmica e de mucosa em vários tipos de estratégias vacinais (Boyaka *et al.*, 1999; Hultgren *et al.*, 2001; Kovarik *et al.*, 2001).

Outros estudos também têm demonstrado que certas linhagens de BAL são capazes de estimular funções imunes no hospedeiro, conferindo certa proteção contra patógenos em animais e humanos. Dessa forma, linhagens de BAL vêm sendo testadas como adjuvantes (Seegers, 2002; Shu & Gill, 2002). Os *Lactobacillus* foram as primeiras BAL a serem administradas vivas, por via oral, produzindo efeitos benéficos à microbiota digestiva (Nicoli & Vieira, 2000).

Recentemente, várias espécies de *Lactobacillus* vêm sendo utilizadas como adjuvantes de mucosa, devido às suas propriedades probióticas e de imunomodulação (Neumann *et al.*, 1998; Perdígón *et al.*, 2001; Seegers, 2002; Shu & Gill, 2002). Um exemplo é a linhagem de *Lb. delbrueckii* (UFV_H2b20, previamente descrita como *Lb. acidophilus*), considerada como probiótica, capaz de resistir às condições estressantes do trato gastrointestinal e de estimular o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro (Neumann *et al.*, 1998).

Linhagens recombinantes de *L. lactis* também vêm sendo testadas como adjuvantes de mucosa como, por exemplo, linhagens secretoras de interleucina-2 e interleucina-6 que, quando associadas a *L. lactis* recombinantes, produzindo TTFC, foram capazes de elevar altamente os níveis de anticorpos TTFC-específicos, ao serem administradas pela via intranasal em camundongos (Steidler *et al.*, 1998).

5. Linhagens recombinantes de *L. lactis* utilizadas como vacinas vivas

O *L. lactis* têm uma passagem transitória pelo trato gastrointestinal, de aproximadamente 24 horas, mas permanece metabolicamente ativo na região cecal do intestino (Drouault *et al.*, 1999). Além disso, a disponibilidade de diversos sistemas de expressão e de endereçamento celular das proteínas possibilitou o desenvolvimento de linhagens recombinantes de *L. lactis*, produtoras de antígenos heterólogos, para serem testadas como uma nova estratégia de vacinação oral (Wells *et al.*, 1995). A maioria desses estudos foi realizada baseando-se nas respostas imunes com o antígeno modelo TTFC. Em 1995, Norton e colaboradores testaram linhagens recombinantes produtoras do TTFC na imunização oral de camundongos. Níveis significantes de IgA entérica foram obtidos, enquanto respostas sistêmicas ao imunógeno pareciam estar confinadas a um pequeno aumento na quantidade de anticorpos anti-TTFC, produzido nas células de linfonodos mesentéricos e do baço. Estudos posteriores mostraram que camundongos, após serem imunizados com linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras do TTFC intracelular, atingiram níveis significativamente altos de IgG e também foram capazes de produzir IgA fecal TTFC-específica, além de ficarem

protegidos contra o desafio da toxina tetânica em dose letal (Wells *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1997; Grangette *et al.*, 2002).

Linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras da proteína 4 não estrutural do rotavírus bovino (NSP4) também demonstraram induzir uma resposta imune específica em coelhos, produzindo anticorpos anti-NSP4 (Enouf *et al.*, 2001) e o alérgeno beta-lactoglobulina bovina (BLG), produzido em *L. lactis*, mostrou ser capaz de induzir a produção de IgAs anti-BLG em camundongos, quando administrado pela via oral (Chatel *et al.*, 2001). No entanto, nem todo antígeno expresso em *L. lactis* é capaz de induzir uma resposta imune antígeno-específica e protetora, pois existem vários fatores que influenciam o desenvolvimento dessas respostas como o regime de vacinação adotado, o tipo de antígeno, a dose aplicada, a quantidade produzida e a localização celular do antígeno (Norton *et al.*, 1996). A subunidade B da urease de *Helicobacter pylori* (UreB) foi expressa no citoplasma de *L. lactis* e cinco diferentes regimes de imunização oral foram testados e comparados. Em apenas um destes regimes os camundongos vacinados foram capazes de induzir uma resposta imune sistêmica antígeno-específica, mas, no entanto, não foram protegidos contra o desafio com *H. pylori* SS1 (Lee *et al.*, 2001).

Recentemente, outros antígenos foram expressos com sucesso em *L. lactis*, como a proteína E7 do papilomavírus do tipo 16 e a proteína ribossomal L7/L12 de *B. abortus* (Bermudez *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2002 a). Estudos, utilizando as construções com o antígeno L7/L12 em estratégias vacinais, foram realizados neste trabalho de dissertação de mestrado.

6. Linhagens recombinantes de *L. lactis*: utilização como vacinas orais contra a brucelose

6.1. O gênero *Brucella*

As bactérias do gênero *Brucella* são pequenos cocobacilos, Gram-negativas, imóveis, não esporulantes e não encapsulantes. Duas características interessantes da organização do genoma da *Brucella* são a presença de dois cromossomos e a ausência de plasmídeos (Michaux *et al.*, 1993). O genoma é constituído de $3,6 \times 10^6$ pb e é homogêneo entre as várias espécies, apresentando acima de 95% de homologia em estudos de pareamento DNA-DNA (Verger *et al.*, 1985). As seis espécies são classicamente divididas de acordo com as características metabólicas e antigênicas e são consideradas como subespécies, exibindo preferência pelos diferentes hospedeiros: *B. abortus*, infecta bovinos; *B. melitensis*, infecta caprinos; *B. suis*, infecta suínos; *B. ovis*, infecta ovinos; *B. canis*, infecta caninos e *B. neotomae* infecta roedores (Freny *et al.*, 2000). Estudos genômicos indicaram que a organização cromossômica dessas seis espécies é bem similar (Ugalde, 1999) e o seqüenciamento do rRNA 16S e a análise da composição do LPS (Moreno *et al.*, 1990) mostraram a relação filogenética do gênero *Brucella* com os gêneros *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobacterium* e *Rhizobium*. Todos esses gêneros pertencem ao subgrupo α da classe Proteobactéria.

Dentro das seis subespécies, *B. melitensis* é a mais patogênica para humanos, embora a infecção por *B. abortus* represente um risco maior por ser a espécie mais difundida no mundo. O recente isolamento de uma linhagem distinta de mamífero

marinho amplia o espectro de animais que podem ser infectados por essa bactéria e potencializa a sua importância como zoonose (Bricker *et al.*, 2000).

6.2. A brucelose

No ano de 1887, David Bruce isolou pela primeira vez o microrganismo causador da “Febre de Malta”, uma enfermidade muito difícil de diferenciar sintomática e clinicamente de outras febres endêmicas do litoral Mediterrâneo e que causava grande debilidade física e levava à morte alguns soldados ingleses residentes nessa ilha. O agente dessa patologia era uma bactéria que foi denominada, pelo seu descobridor, *Micrococcus melitensis*. Posteriormente, foi descoberto que a mesma era transmitida através do consumo de leite de cabras existentes no local (Bruce, 1887).

Em 1895, Bernhard Bang isolou, proveniente de um caso de aborto bovino, um cocobacilo Gram-negativo, o qual foi denominado “*Bacillus abortus*”. Algum tempo depois, observou-se um grande parentesco entre os dois microrganismos e decidiu-se denominar este novo gênero, *Brucella*, em homenagem ao seu descobridor, David Bruce (Meyer, 1990). Ambos os microrganismos eram capazes de infectar homens e animais, sendo a brucelose considerada, assim, uma zoonose.

As bactérias do gênero *Brucella* são patogênicas para o homem e causam febre ondulante, endocardite, osteomielite e complicações neurológicas, enquanto nos animais domésticos aborto e infertilidade são os sinais característicos dessa doença. A brucelose é uma enfermidade adquirida principalmente pelo contato com animais infectados ou através do consumo de leite e seus derivados contaminados. Assim, o controle da

brucelose animal é um requisito para o controle da doença em humanos (Corbel, 1997; Hansen & Ramuz, 2000).

6.3. Patogênese

A *Brucella* penetra no hospedeiro pelas mucosas oral, nasal, genital, conjuntival ou pela epiderme e seu mecanismo geral de invasão, tanto em bovinos como em outros animais domésticos, se dá da seguinte forma: i) sobrevivência no sítio de invasão primária, ii) entrada em fagócitos e proliferação, iii) invasão da corrente sanguínea e circulação dentro de fagócitos, iv) disseminação em órgãos, especialmente baço, fígado, medula, nódulos linfáticos, rins e útero (Smith & Ficht, 1990).

Após a invasão, as espécies do gênero *Brucella* permanecem nas células do sistema reticuloendotelial, particularmente as células fagocíticas do sistema imune, sendo capazes também de se multiplicar em células não fagocíticas. Esses microrganismos conseguem se manter nas células fagocíticas, uma vez que são capazes de impedir a atividade bactericida das mesmas e se replicar normalmente nesse local. Na infecção inicial, os macrófagos são relativamente ineficientes no combate às bactérias intracelulares. Estas são, então, transportadas se disseminando amplamente nos tecidos linfóides regionais causando a morte de macrófagos e células fagocíticas polimorfonucleadas, sendo então liberadas e podendo invadir outras células. Esses tecidos linfóides constituem, portanto, a porta de entrada até órgãos ricos em elementos do retículo endotelial, como nódulos linfáticos, baço, fígado, medula óssea e também órgãos reprodutivos. Os sintomas da doença são diversificados, dependendo do hospedeiro (Smith & Ficht, 1990).

A *Brucella* possui a capacidade de metabolizar o eritritol nos testículos, vesículas seminais e nos produtos da concepção encontrados em fêmeas gestantes. Esse composto estimula enormemente a multiplicação da bactéria, principalmente devido ao fato da energia produzida pelo seu metabolismo ser maior do que a produzida pela utilização da glicose (27ATP/molécula vs 12ATP/molécula). Sendo assim, o eritritol representa um potente fator de tropismo celular, fazendo com que as populações bacterianas tornem-se densas nesses locais, podendo levar ao choque endotóxico, sendo o aborto a principal consequência (Smith & Ficht, 1990). Finalmente, acredita-se que, após o aborto, o microrganismo abandona o útero e permanece no úbere, onde a infecção se mantém até a gestação seguinte, tornando-se, então, crônica. Entre os anestros gestacionais, a bactéria também pode ser encontrada nos nódulos linfáticos associados ao úbere, útero, trato digestivo, e baço. Nas demais gestações, não se observam abortos, mas o bezerro pode nascer infectado por *Brucella*. Em animais machos, esses microrganismos podem ser encontrados no epidídimo e testículos (Smith & Ficht, 1990).

6.4. Prevenção

A profilaxia da brucelose baseia-se no diagnóstico e eliminação dos animais infectados, haja vista que o agente é um parasita intracelular e o tratamento desses animais é prolongado, tornando-o economicamente inviável. A pasteurização dos produtos lácteos e seus derivados e a proteção para as pessoas expostas ao microrganismo constituem medidas co-adjuvantes para evitar que essa doença atinja os seres humanos (Smith & Ficht, 1990).

Todas as tentativas de vacinação humana foram ineficientes e perigosas. Sendo assim, a prevenção da brucelose em humanos depende, até o momento, da erradicação ou controle da doença no animal hospedeiro. Entretanto, a *Brucella* é um dos organismos que podem ser utilizados como armas biológicas, havendo, assim, uma necessidade real de se desenvolver uma vacina que seja eficaz no controle dessa enfermidade. (Elberg, 1986).

As vacinas vivas têm-se mostrado, até o momento, superiores às vacinas mortas na prevenção da brucelose animal. Recentes estudos, utilizando linhagens da *B. abortus* 19 viva e morta pelo calor, foram realizados com o objetivo de testá-las quanto à capacidade de induzir proteção. Os resultados mostraram que a bactéria viva apresentou capacidade de induzir uma imunidade protetora muito maior que aquela apresentada pela bactéria morta (Zhan & Cheers, 1998).

Atualmente, a vacinação contra infecções por *Brucella* é feita através da administração de linhagens lisas atenuadas da *B. abortus* (S19) e da *B. melitensis* (Rev 1). A S19 é efetiva contra *B. abortus* em bovinos, enquanto a Rev 1 é efetiva contra *B. melitensis* e *B. ovis* em cabras e ovelhas, respectivamente. Porém, ambas as vacinas possuem três desvantagens: são patogênicas para o homem, podem causar aborto quando administradas em fêmeas gestantes e induzem a produção de anticorpos em animais imunizados, interferindo no diagnóstico de populações infectadas (Cheville *et al.*, 1993).

Várias estratégias têm sido utilizadas com o objetivo de produzir uma vacina viva atenuada que não possua os problemas citados anteriormente. Uma dessas estratégias é a utilização de linhagens rugosas vivas atenuadas da *Brucella*, em especial *B. abortus* RB51, que consiste em um mutante da linhagem virulenta 2308, resistente à

rifampicina (Schurig *et al.*, 1991). Essa linhagem, quando usada em dose única, tem seu efeito protetor em bovinos similar ao provocado pela linhagem 19, com a vantagem de não induzir a produção de anticorpos normalmente detectados nos testes sorológicos convencionais, devido à ausência de antígeno-“O”, podendo ser diferenciada de isolados de campo. Estudos preliminares sobre a biossegurança dessa vacina têm demonstrado que ela não provoca reversão de virulência, nem aborto em fêmeas gestantes. Entretanto, essa vacina apresenta algumas desvantagens como, por exemplo: veterinários e trabalhadores rurais expostos à RB51, quando testados pelos métodos sorológicos convencionais, mostram resultados negativos, dificultando assim o tratamento dessa população de risco. Outro ponto negativo é o fato dessa linhagem ser resistente a rifampicina, um dos antibióticos utilizados no tratamento contra a brucelose (Morbidity and Mortality Weekly Report, 1998).

Uma outra estratégia consiste no uso de vacinas de DNA, baseada no uso do DNA plasmidiano para induzir uma resposta imune protetora através da injeção direta do DNA no tecido animal. O número de estudos, utilizando essa tecnologia do DNA recombinante no desenvolvimento de vacinas contra a brucelose, ainda é limitado e realizado em animais modelos de laboratório (Schuring *et al.*, 2002). Kurar and Splitter (1997) utilizaram o gene da proteína ribossomal L7/L12 da *B. abortus* para a construção de vacinas de DNA, tendo os camundongos vacinados apresentado uma resposta imune celular L7/L12-específica e níveis de proteção significativos contra a brucelose experimental (Kurar & Splitter., 1997). Vacinas de DNA codificando a P39 (proteína de ligação periplasmática) da *Brucella* foram capazes de induzir uma resposta humoral e celular em camundongos BALB/c, além de um nível moderado de proteção contra a linhagem selvagem *B. abortus* 544 (Al-Mariri *et al.*, 2001a) A vacina de DNA,

codificando a lumazine sintetase de *B. abortus*, também induziu uma resposta imune humoral, celular e protetora em camundongos BALB/c (Velikovsky *et al.*, 2002). Novos antígenos bacterianos, que induzam uma resposta imune celular protetora, ainda necessitam ser identificados.

Recentemente, têm-se dado ênfase à administração de vacinas orais, uma vez que a porta de entrada da *Brucella* no hospedeiro ocorre através das mucosas. No gado, a via oral, é considerada uma das vias primárias de transmissão da brucelose. Dessa forma, seria interessante o desenvolvimento de vacinas vivas orais que fossem capazes de produzir anticorpos, através da estimulação antigênica local (mucosa), sustentada por uma resposta imune celular adquirida. Em 1970, Chen e Elberg demonstraram a indução de respostas imunes, através da administração oral da linhagem viva Rev. I, em camundongos, porco-da-índia e primatas. Nicolleti e Milward, em 1983, observaram proteção contra a *B. abortus* 2308 ao vacinarem o gado oralmente com a linhagem S19. Em 1996, Stevens e colaboradores mostraram que camundongos vacinados oralmente com a linhagem RB51 foram efetivos na indução de imunidade protetora contra a infecção da *B. abortus* 2308. No entanto, mais estudos avaliando a administração oral dessas linhagens devem ser realizados, visando uma vacinação alternativa contra brucelose.

6.5. A resposta imune

Hoje, muitos progressos referentes ao estudo da resposta imune protetora contra a *Brucella* já foram alcançados. A identificação de antígenos da *Brucella* que induzem uma resposta imune protetora e o estudo do mecanismo pelo qual as cepas virulentas da

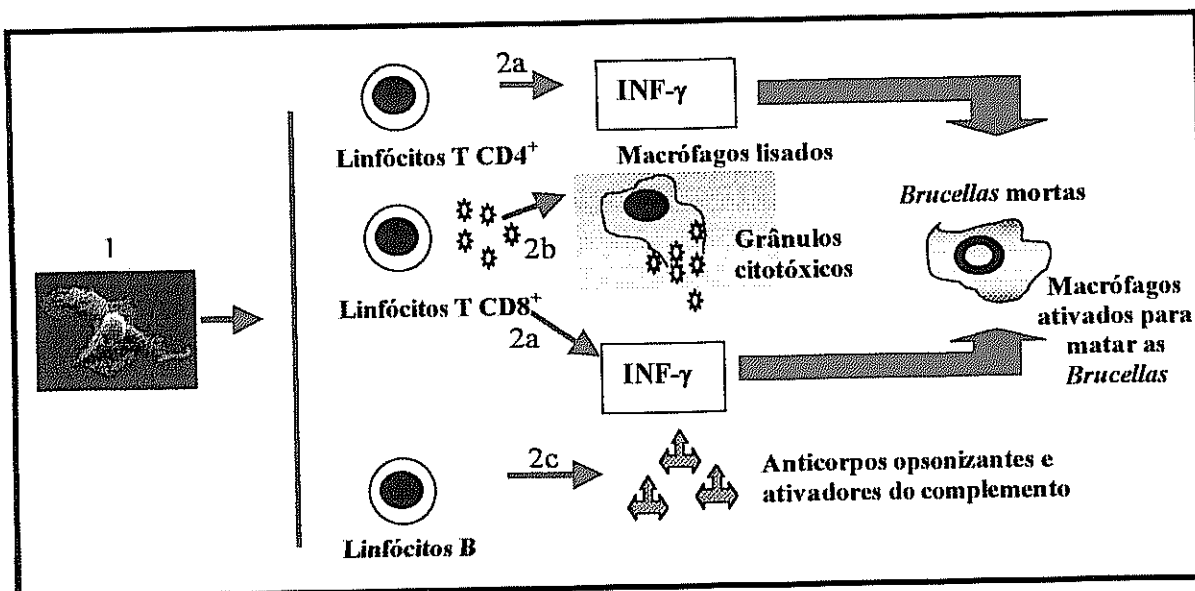


FIGURA 4: Resposta imune protetora contra a *Brucella abortus*. (1) Infecção dos macrófagos pela *B. abortus*. (2a) Ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e secreção de INF- γ responsável pela ativação dos macrófagos e resolução da infecção. (2b) Ativação dos mecanismos bactericidas dos macrófagos e da lise das células infectadas pelos linfócitos T CD8⁺. (2c) Ativação dos linfócitos B e a produção de anticorpos opsonizantes e ativadores do complemento.

Brucella persistem no hospedeiro vêm sendo amplamente avaliados (Cheers & Pagram, 1979; Oliveira & Splitter, 1996; Õnate *et al.*, 1999; Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000; Rosinha *et al.*, 2002 a, b). Sabe-se que o estabelecimento da infecção crônica é provavelmente resultado da habilidade desse microrganismo sobreviver e se replicar nos macrófagos do hospedeiro, ficando inacessíveis aos mecanismos extracelulares de controle do hospedeiro, inclusive anticorpos e complementos. A fase bactericida no modelo murino coincide com o início da imunidade celular (Araya *et al.*, 1989). Essa depende principalmente da produção de citocinas pelos linfócitos do tipo Th1, que ativam os mecanismos bactericidas dos macrófagos e da lise das células infectadas pelos linfócitos T CD8⁺ (FIG. 4) (Cheers & Pagram, 1979; Baldwin *et al.*, 1993; Oliveira & Splitter, 1995).

A capacidade de antígenos específicos em induzir, preferencialmente, um perfil de resposta imune Th1 e Th2 é um aspecto importante no processo de resolução da infecção, através da produção de citocinas, moléculas importantes na regulação do tipo de resposta imune, induzida pelo hospedeiro e, conseqüentemente, da infecção (WHO, 1998). Linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ secretam citocinas do tipo Th1 que são responsáveis pelo processo de resolução da infecção pela *Brucella* (Oliveira *et al.*, 1996,1998). Dentre elas, o INF- γ é a principal citocina efetora contra a infecção por bactérias intracelulares, incluindo a *Brucella* (FIG. 4).

6.6. Antígenos da *B. abortus*

Para o desenvolvimento de novas vacinas contra a brucelose, torna-se imperativo a procura e a identificação de antígenos protéicos, capazes de induzirem uma

resposta imune celular protetora. Hoje, poucos antígenos de *Brucella*, capazes de estimular uma imunidade celular protetora, são conhecidos (Oliveira *et al.*, 2002). A proteína ribossomal L7/L12 foi identificada como molécula imunodominante e como capaz de induzir uma resposta imune celular antígeno-específica e protetora em camundongos (Oliveira & Splitter, 1994,1996). Recentemente, foi mostrado que a P39 da *B. abortus* associada a motivos CpG, como adjuvante, protege os animais experimentais contra o desafio com a linhagem selvagem (Al-Mariri *et al.*, 2001a, b, 2002). Vemulapalli *et al.* (1998) mostrou que camundongos infectados pela *Brucella* desenvolviam resposta humoral e celular à proteína YajC, sugerindo que essa suposta proteína de membrana tenha envolvimento na resposta imune contra esse patógeno. Outras proteínas como UvrA e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a proteína de choque térmico GroEL, considerada um potente imunógeno, mostraram ser capazes de estimularem a proliferação dos linfócitos e de induzirem citocinas do tipo 1 (Oliveira *et al.*, 1996; WHO, 1998; Baloglu *et al.*, 2000; Leclercq *et al.*, 2001; Rosinha *et al.*, 2002a).

As proteínas de estresse térmico HtrA e DnaK, que possuem papel importante na sobrevivência da *Brucella*, dentro dos macrófagos, foram identificadas como antígenos e podem estar envolvidas em respostas imunes celulares (WHO, 1998). Em mutantes da *B. suis* para o gene *dnaK*, observou-se uma redução na multiplicação de macrófagos, sugerindo que essa proteína esteja envolvida com o mecanismo de virulência da *Brucella* (Kohler *et al.*, 1996). Mutantes de *B. abortus* S2308 que tiveram os genes *htrA* e *cycL* deletados foram, então, inoculados em fêmeas no meio da gestação. Os resultados mostraram que a linhagem mutante não era capaz de provocar aborto e promovia a diminuição da resistência dessa bactéria na eliminação de neutrófilos e

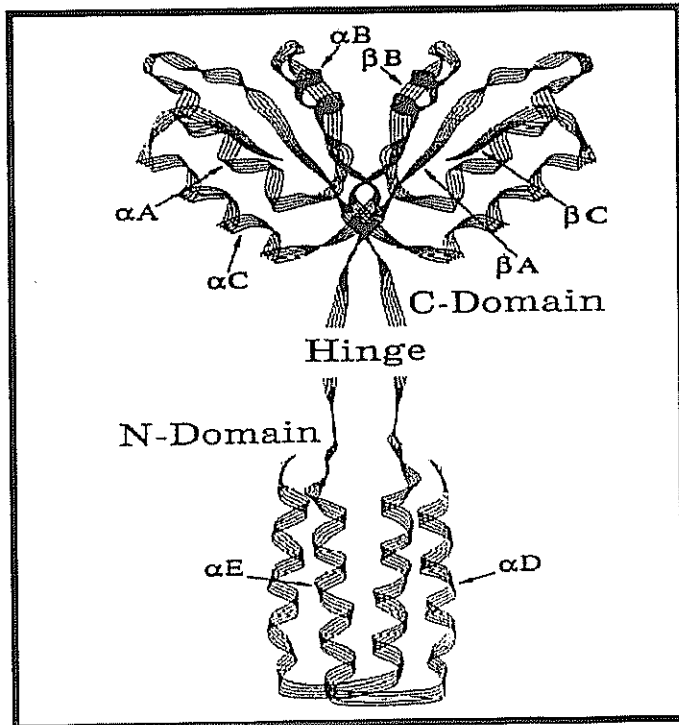


FIGURA 5: Estrutura secundária do dímero da proteína L7/L12

FONTE: Gudvok, 1997.

macrófagos (Edmonds *et al.*, 2000). Algumas dessas novas proteínas, já identificadas, podem ser utilizadas como peptídeos antigênicos na ativação da resposta protetora contra a brucelose.

6.6.1. Proteína ribossomal L7/L12

A proteína ribossomal L7/L12 tem o seu papel funcional precisamente determinado, estando envolvida em interações com fatores traducionais, durante a biossíntese protéica (Gudkov, 1997). A L7/L12 é uma proteína de 12 kDa, mas em experimentos de sedimentação em solução, sem agentes desnaturantes, essa proteína apresenta uma massa molecular de aproximadamente 24 kDa. Essa proteína forma dímeros estáveis e está presente em quatro cópias no ribossomo (FIG. 5; Gudkov, 1997). O domínio N-terminal da proteína é fundamental na formação do dímero e no seu ancoramento no ribossomo, através da sua ligação com a proteína ribossomal L10. O domínio C-terminal é necessário para a ligação dos fatores traducionais (Savelsbergh *et al.*, 2000; Wieden *et al.*, 2001).

Os genes *L7/L12* e *L10* estão organizados em um operon (*rplJL*), cuja sequência em *Brucella abortus* foi totalmente determinada (Oliveira *et al.*, 1994). Esses codificam proteínas ribossômicas associadas a subunidade 50S, essenciais nos ribossomos bacterianos para o funcionamento correto dos fatores traducionais de alongamento EF-G e EF-Tu, envolvidos na síntese protéica (Oliveira *et al.*, 1994).

A proteína recombinante L7/L12 é importante na indução de uma resposta imune celular, pois induz a proliferação de linfócitos T CD4 (Oliveira & Splitter, 1994). Em 1996, Oliveria e Splitter relataram, pela primeira vez, que uma proteína ribossomal

poderia ser utilizada como vacina contra a brucelose. Nesse estudo, eles mostraram que a inoculação da proteína recombinante L7/L12 da *B. abortus* em camundongos BALB/c induzia uma proteção parcial contra o desafio com a cepa virulenta S2308 (Oliveira & Splitter, 1996). Já em 1997, Kurar e Splitter criaram uma vacina de DNA utilizando vetores, contendo o gene L7/L12. Esses estudos mostraram a indução de anticorpos L7/L12-específicos e de respostas imunes mediadas por linfócitos T em camundongos BALB/c. Após o desafio desses animais com a linhagem selvagem foi observado um nível de proteção significativo.

A proteína L7/L12 de *M. bovis* (Kitaura *et al.*, 1999) e *B. melitensis* (Bachrach *et al.*, 1994) são similares a de *B. abortus* e provocam uma alta hipersensitividade em porcos da Índia. L7/L12 também é o componente mais ativo da brucelina INRA (Institute National de la Recherche Agronomique), um extrato aquoso de uma linhagem rugosa de *B. melitensis*, formado por mais de 20 proteínas de diferentes pesos moleculares, utilizado em testes cutâneos, no homem e nos animais, para detecção da brucelose (de Reviere & Fensterbank, 1984; Bureau *et al.*, 1989). No entanto, a brucelina INRA não é capaz de proteger os camundongos contra a infecção da *B. abortus*, provavelmente por causa do antagonismo entre L7/L12 e os outros componentes de outras frações celulares da *Brucella*. Isso sugere que proteínas individuais possam ser utilizadas como antígenos potenciais de vacinas de subunidades na indução de uma resposta imune celular protetora (WHO, 1998). Estudos mostraram que micropartículas inertes e lipossomos podem ser usados como veículos para apresentação de antígenos e levantaram a possibilidade de que bactérias não colonizadoras do trato gastrointestinal, como o *L. lactis*, possam expressar altos níveis do antígeno antes da sua inoculação, podendo ser similarmente útil para apresentação de antígenos.

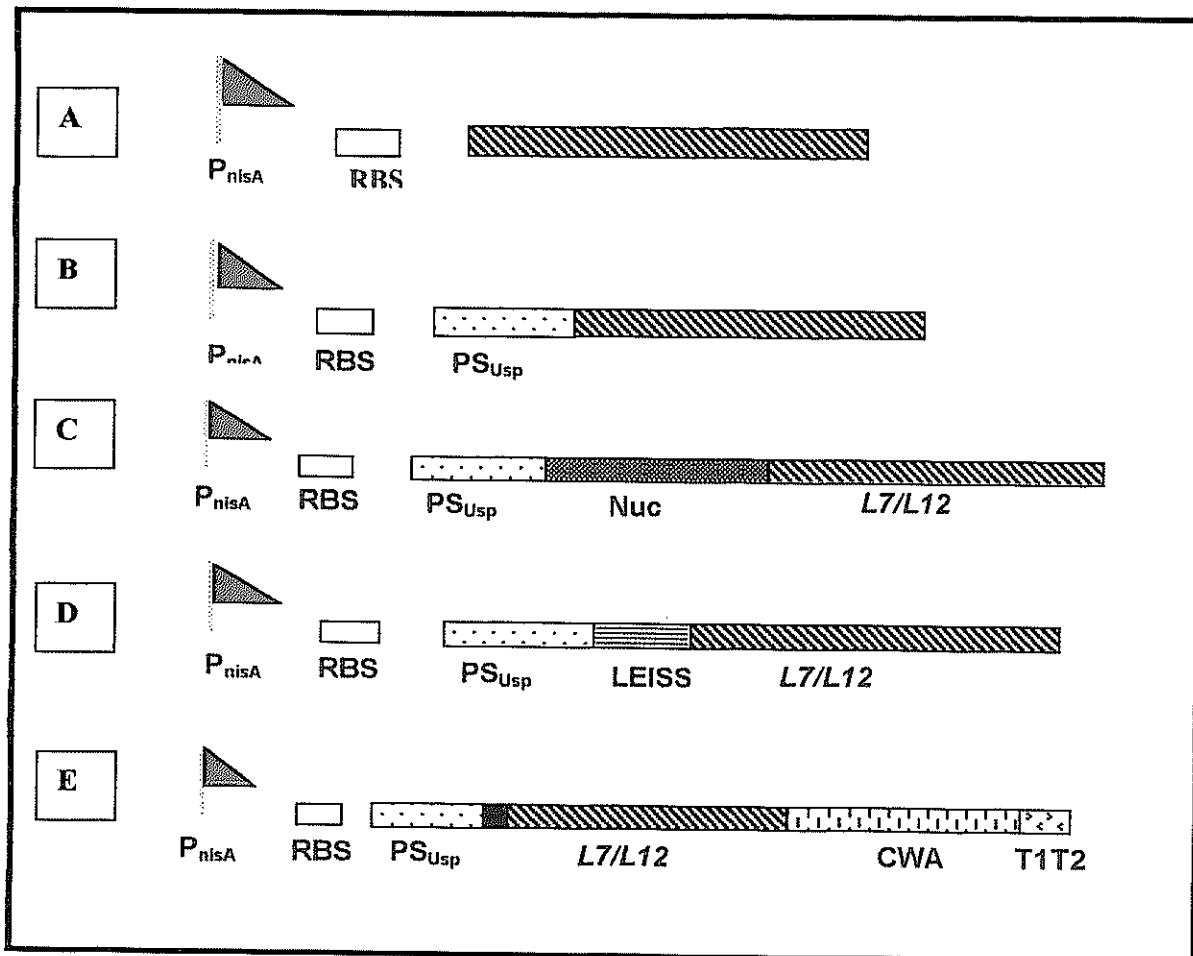


FIGURA 6: Estruturas esquemáticas da unidade transcricional para produção e exportação de L7/L12. (▲) P_{nisA} , promotor induzido por nisina; (□) RBS, sítio de ligação do ribossomo do gene *usp45*; (▨) PS_{Usp45} , peptídeo sinal de Usp45; (▩) Nuc, nuclease de *Staphylococcus aureus*; (▧) LEISS, sequência codificadora do propeptídeo sintético LEISSTCDA; (■) os primeiros 11 aminoácidos de Usp45; (▨) L7/L12, fragmento que codifica a proteína madura L7/L12; (▩) CWA, sequência codificadora da proteína da parede celular M6; (▨) T1T2, sinal de terminação do gene triptofano de *L. lactis*.

FONTE: Ribeiro *et al.*, 2002 a.

Recentemente, o nosso grupo associado com o grupo francês do Dr. Phillippe Langella, construiu linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras do antígeno L7/L12 de *B. abortus*. Nesse trabalho a proteína ribossomal L7/L12 foi expressa sob o controle do promotor indutível P_{nisA} em três localizações diferentes : citoplasma, parede celular e meio extracelular. Para exportação, o gene codificador dessa proteína foi fusionado ao peptídeo sinal do gene *usp45*. Visando aumentar a eficiência de secreção, foram feitas duas novas construções: (i) fusão do gene *L7/L12* ao gene da nuclease (*nuc*) de *S. aureus*; (ii) fusão de um propeptídeo sintético de nove aminoácidos (LEISSTCDA) à extremidade N-terminal do peptídeo maduro de L7/L12 (FIG. 6) (Ribeiro *et al.*, 2002 a). A fusão de L7/L12 com o propeptídeo sintético aumentou a eficiência de secreção da proteína 50%. Para o ancoramento da proteína na parede celular, a proteína M6 foi fusionada à extremidade C-terminal de L7/L12. Todas as fusões descritas permitiram a produção e o endereçamento da proteína L7/L12 para os três diferentes compartimentos celulares (Ribeiro *et al.*, 2002 a). Foi a primeira vez que um antígeno de *B. abortus* foi produzido em uma BAL e essas construções mostraram ser uma estratégia alternativa de vacinação contra a brucelose.

6.6.2. GroEL e a família de proteínas de choque térmico

As proteínas de choque térmico fazem parte de um grupo de moléculas codificadas por genes que são ubiquamente induzidos quando as células são expostas a temperaturas elevadas ou a outra variedade de estresse. A resposta ao choque térmico é altamente conservada e permite aos organismos se adaptarem às condições ambientais de estresse (Lin *et al.*, 1992). Essas proteínas podem ser, também, chamadas de

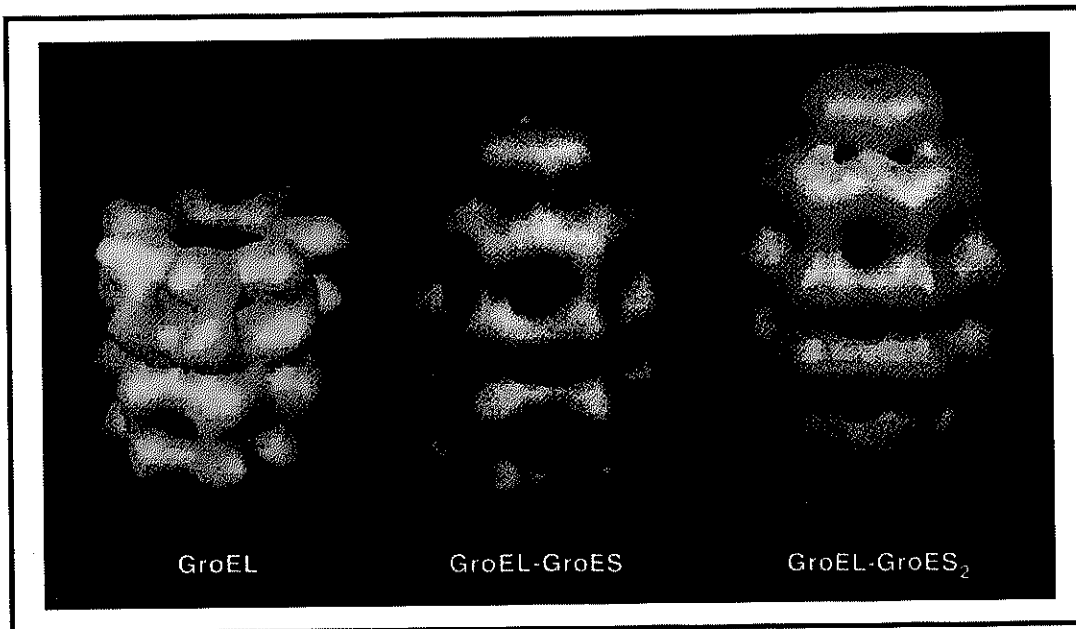


FIGURA 7: Estrutura tridimensional da proteína GroEL e os complexos distintos formados por GroEL e GroES. Cada um dos anéis do GroEL possui uma cavidade que fecha uma de suas extremidades. Esta extremidade determina sua morfologia quando se une ao GroES (complexo GroES-GroEL), de tal maneira que a cavidade se torna maior. A união de GroES aos anéis de GroEL para formar o complexo simétrico GroEL-GroES (GroEL-GroES₂) promove a mesma união nos dois anéis.

FONTE:

http://www.ucm.es/info/antilia/asignatura/practicas/trabajos_ciencia/caperoninas.htm

chaperoninas, pois possuem um importante papel na estabilização conformacional de outras proteínas e no transporte das mesmas através das membranas intracelulares (Xu & Sigler, 1998; Silva, 1999).

As proteínas GroEL e GroES de *E. coli* vêm sendo as mais estudadas dessa família. Esses dois genes são organizados em um operon (GroE), em *B. abortus*, a sequência nucleotídica já foi totalmente determinada (Gor & Mayfield, 1992).

A proteína GroEL é composta por 14 sub-unidades idênticas de 57 kDa que formam dois anéis heptâmeros e simétricos, possui uma cavidade central e está envolvida no processo de enovelamento de proteínas da célula bacteriana. GroEL pode formar um estreito complexo com diversos substratos protéicos em função da flexibilidade intrínseca do seu sítio ativo. Para ligar e liberar polipeptídeos não nativos, GroEL requer a ajuda da proteína GroES e de ATP. Alterando a polaridade de sua superfície entre hidrofóbica e hidrofílica, a proteína GroEL controla o destino do polipeptídeo ligado a ela, enquanto protege o mesmo do meio externo. A ligação e hidrólise do ATP e a ligação com GroES direciona e coordena o processo do enovelamento correto da proteína, alcançando o máximo de eficiência (FIG. 7). GroEL cria um ambiente quimicamente adequado, em meio celular altamente concentrado, que é temporariamente formado para completar o processo em que os genes são expressos em proteínas funcionais (Xu & Sigler, 1998).

Os membros da família da proteína de choque térmico GroEL são completamente conservados no Reino Procarioto e são potentes imunógenos, reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro durante uma infecção (Lin *et al.*, 1996; Silva, 1999; Turner *et al.*, 2000). A proteína GroEL da *B. abortus* já foi identificada e descrita como molécula imunogênica, induzindo uma resposta do tipo celular e humoral,

quando testada *in vitro* e *in vivo* (Lin *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1996; Baloglu *et al.*, 2000). Foi demonstrado, em análise de “western blot” e imunoprecipitação, que essa proteína de choque térmico é capaz de reagir com anticorpos direcionados contra as proteínas de *E. coli* e *M. tuberculosis* (Lin *et al.*, 1992). Plasmídeos expressando o gene *GroEL* de *M. tuberculosis* foram utilizados como vacinas de DNA capazes de induzir uma resposta imune celular e protetora (Bonato *et al.*, 1998).

Leclerq *et al.* (2001) construíram uma vacina de DNA codificando a proteína *GroEL* de *B. abortus*. Os camundongos vacinados apresentaram uma resposta imune celular antígeno-específica do tipo Th1, no entanto não foi observada uma resposta protetora contra o desafio com a *B. abortus* 2308. O papel das respostas imunes ao *GroEL* na imunidade protetora não foi determinado.

Vacinas vivas administradas pela via intragástrica, podem ser uma nova estratégia vacinal para se testar a imunogenicidade desse antígeno, para se analisar as respostas imunes induzidas por *GroEL* quando administrado na mucosa, e quem sabe para se conseguir uma imunidade protetora contra a brucelose experimental.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Objetivo geral:

Desenvolvimento de um novo sistema de vacinação oral, utilizando linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras de antígenos da *B. abortus*, contra a brucelose experimental.

2. Objetivos específicos:

- Confirmação dos níveis de expressão do antígeno L7/L12 por “western blot” das linhagens recombinantes de *L. lactis*.
- Produção e expressão da proteína de fusão Mal:L7/L12 recombinante em *E. coli*.
- Imunização de camundongos BALB/c pela via intragástrica, utilizando as linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras da proteína ribossomal L7/L12 da *B. abortus*.
- Avaliação da produção de anticorpos específicos anti-L7/L12 dos tipos IgG e IgA após a imunização, através da técnica de ELISA.

- Avaliação do nível de proteção dos camundongos vacinados contra a brucelose experimental.

- Clonagem do gene *GroEL* da *B. abortus* em vetores de expressão para expressão da proteína em duas localizações celulares (citoplasma e meio extracelular) em *L. lactis*.

- Avaliação dos níveis de expressão da proteína GroEL pela da técnica de “western blot”.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho

TABELA 5: Linhagens bacterianas

Linhagens	Características	Referência
<i>E. coli</i> TG1	supE, hsd, Δ 5, thi, Δ (lac-proAB), F'(traD36 proAB-lacZ Δ M15.	Gasson, 1983
<i>L. lactis</i> MG1363	Linhagem selvagem.	Gasson, 1983
<i>L. lactis</i> NZ9000	MG1363 (contendo os genes nisR e nisK no cromossomo).	de Ruyter <i>et al.</i> 1996
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> *	Linhagem isolada da medula humana de uma criança de Viçosa, Minas Gerais.	Neumann <i>et al.</i> 1998
LBH153	<i>L. lactis</i> NZ9000 contendo o plasmídeo pSEC:p35-p40.	Bermudez-Humaran
LBH163	<i>L. lactis</i> NZ9000 contendo o plasmídeo pSEC:IL-12.	Bermudez-Humaran
<i>B. abortus</i> S2308	linhagem selvagem.	Coleção do LGCM
<i>B. abortus</i> S19	linhagem vacinal.	Coleção do LGCM

* anteriormente identificado como *Lb. acidophilus*

TABELA 6: Plasmídeos bacterianos

Plasmídeos	Características	Referência
pMal: GroEL	Ap ^r ; pMal-c2 carregando o gene GroEL.	Oliveira <i>et al</i>
pMal:L7/L12	Ap ^r ; pMal-c2 carregando o gene L7/L12.	Oliveira & Splitter, 1994
pVE3702	pGK:Cm ^r ; Nuc maduro expresso sob o controle do promotor P _{nisA} .	P. Langella ^a
pVE3684	pGK:Cm ^r ; vetor de expressão contendo a fusão entre o peptídeo sinal do gene <i>usp45</i> (PS _{usp45}) e o Nuc maduro expresso sob o controle do P _{nisA} .	P. Langella ^a
pVE3719	pGK:Cm ^r ; Nuc maduro fusionado na extremidade 5' com o propeptídeo LEISSTCDA sobre o controle do P _{nisA} .	P. Langella ^a
pCYT:L7/L12	pGK:Cm ^r ; derivado do pVE3702 em que o gene L7/L12 foi colocado no lugar do Nuc.	L. Ribeiro <i>et al</i> ^a , 2002
pANC:L7/L12	pGK:Cm ^r ; derivado do pVE5547 em que o gene L7/L12 foi inserido no lugar do Nuc.	L. Ribeiro <i>et al</i> ^a , 2002
pSEC:LEISS:L7/L12	pGK:Cm ^r , derivado do pVE3719 em que o gene L7/L12 foi inserido no lugar do Nuc.	L. Ribeiro <i>et al</i> ^a , 2002
PCYT ₅₉ :L7/L12	pIL252: Er ^r ; derivado do pVE5529 em que o gene L7/L12 foi inserido no lugar do Nuc.	L. Ribeiro <i>et al</i> ^a , 2002
PSEC ₅₉ :L7/L12	pIL252: Er ^r ; derivado do pVE5523 em que o gene L7/L12 foi inserido no lugar do Nuc.	L. Ribeiro <i>et al</i> ^a , 2002
pTOPO:CYT:GroEL	Derivado do pCRR II-TOPO em que o fragmento contendo a sequência do gene <i>GroEL</i> para forma citoplasmática foi inserido no sítio de clonagem	Este trabalho
pTOPO:SEC:GroEL	Derivado do pCRR II-TOPO em que o fragmento contendo a sequência do gene <i>GroEL</i> para a forma secretada foi inserido no sítio de clonagem	Este trabalho
pTOPO:SEC:LEISS:GroEL	Derivado do pCRR II-TOPO em que o fragmento contendo a sequência do gene <i>GroEL</i> para a forma secretada foi inserido no sítio de clonagem	Este trabalho
pCYT: GroEL	pGK:Cm ^r ; derivado do pVE3702 em que o gene GroEL foi inserido no lugar do Nuc.	Este trabalho

TABELA 6: Continuação

pSEC: GroEL	pGK:Cm ^r ; derivado do pVE3684 em que o gene GroEL foi inserido no lugar do Nuc.	Este trabalho
pSEC:LEISS: GroEL	pGK:Cm ^r , derivado do pVE3719 em que o gene GroEL foi inserido no lugar do Nuc.	Este trabalho

Ap^r : resistência à ampicilina; Cm^r : resistência à cloranfenicol; Ery^r : resistência à eritromicina

^a : Laboratório de Pesquisa Leiteira Aplicada (URLGA) do INRA.

2. Condições de cultivo

As linhagens de *L. lactis* foram cultivadas em meio M17 (DIFCO) suplementado com 0,5% de glucose ou “Brain Heart Infusion” (BHI, DIFCO) a 30°C. Quando necessário, as culturas de *L. lactis* foram ainda suplementadas com cloranfenicol (5 µg/ml ou 10 µg/ml) ou eritromicina (5 µg/ml). A linhagem de *Lb. delbrueckii* foi cultivada em meio “Lactobacilli MRS Broth” a 37°C. As linhagens de *E. coli* TG1 foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB, DIFCO) ou SOC (GIBCO BRL) a 37°C e quando necessário foram adicionados cloranfenicol (5 µg/ml ou 10 µg/ml) ou eritromicina (5 µg/ml) ou ampicilina (100 µg/ml). As linhagens de *B. abortus* foram cultivadas no meio “Brucella Broth” (DIFCO). Esses meios foram suplementados com 1,5% de ágar bacteriológico para culturas em meio sólido.

3. Construção das linhagens de *L. lactis* produtoras da proteína de choque térmico GroEL da *B. abortus*

3.1. Clonagem intermediária em *E. coli*

3.1.1. Extração e dosagem do DNA plasmidiano

A bactéria *E. coli*, contendo o plasmídeo pMAL/GroEL (Oliveira *et al.*, 1996), foi cultivada em meio LB, adicionado de 100 µg/ml de ampicilina, e o DNA plasmidiano foi extraído pelo método da lise alcalina, utilizando-se o Kit Wizard mini-prep (Promega).

Cinco microlitros de DNA plasmidiano, acrescentado de tampão de amostra (azul de bromofenol 0.5%, glicerol 25%), foi depositado em gel de agarose 1% TAE (tris base 40 mM, pH 7,2; NaOAc 20 mM; EDTA 1 mM) contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml). A corrida eletroforética foi efetuada a 100 V, durante 60 min. em cuba horizontal. A quantificação do DNA foi estimada a partir da comparação da intensidade das amostras com a do DNA de fago lambda (Stratagene) na concentração de 55 ng/µl.

3.1.2. Amplificação do gene *GroEL* por PCR

O gene *GroEL* de *B. abortus* foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se como amostra de DNA o vetor de expressão pMAL:GroEL (Oliveira *et al.*, 1996). Iniciadores contendo um sítio de restrição artificial para cada uma das extremidades do gene *GroEL* foram sintetizados, de acordo

com a sequência nucleotídica do mesmo (número de acesso no “Genbank” M82975).

Para secretar a proteína *GroEL*, foram utilizados os iniciadores: 5' (5' GGATGCATCAGCTGCAAAAGACGTA 3'); em que o sítio artificial para enzima de restrição *NsiI* está sublinhado e as bases CA, em negrito, foram adicionadas para adaptar a fase de leitura da sequência codificadora do peptídeo sinal da proteína Usp45 à fase de leitura do *GroEL*) e o 3' (5' GGGTTAACTTAGAAGTCCATGCC 3'); em que o sítio artificial para enzima de restrição *HpaI* está sublinhado). Para produção da proteína *GroEL* no citoplasma, os oligonucleotídeos utilizados foram: 5' (5' GGATGCATGCTGCAAAAGACGTAA 3'), (o sítio *NsiI* está sublinhado) e o 3' é o mesmo descrito para amplificação da forma secretada.

As reações de PCR continham: 20 ng do DNA , 20 pmoles de cada iniciador, 0,25 mM de dNTPs, 0,1 unidades de Taq DNA polimerase, 2 mM de MgCl₂ (GIBCO BRL) e 5 µl do tampão da enzima concentrado 10X. A amplificação por PCR foi realizada, utilizando o aparelho termociclador “Mini-cyclerTM MJ Research”, cujo programa foi: 95°C durante 5 min. (1ª desnaturação), 29 ciclos de desnaturação de 95°C durante 1 min., anelamento à 60°C durante 45 segundos, extensão à 72°C durante 4 min. Em seguida, 2/10 do volume de cada amostra foi analisado em gel de agarose 1% (item 3.1).

3.1.3. Purificação do fragmento amplificado

Os fragmentos de DNA amplificados foram recuperados do gel de agarose e purificados, utilizando e seguindo o protocolo do “Kit CONCERTTM Rapid Gel Extraction System” (GIBCO BRL).

3.1.4. Clonagem do gene *GroEL* de *B. abortus* no vetor pCR_R II-TOPO

Os produtos purificados foram, em seguida, subclonados no vetor pCR_R II-TOPO (Invitrogen), dando origem a duas construções intermediárias, pTOPO:SEC:GroEL (forma secretada) e pTOPO:CYT:GroEL (forma citoplasmática), utilizadas para transformarem *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) de acordo com o protocolo do “Kit TOPO TA Cloning” (Invitrogen).

Após a transformação, as culturas foram semeadas em meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 µg/ml), XGAL (40 µg/ml) e IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (0,04 mM) e incubadas a 37°C, durante 18 horas, para seleção das colônias positivas.

3.1.5. Verificação da presença e tamanho dos insertos dos clones

As colônias brancas obtidas após a transformação tiveram o inserto do DNA plasmidiano, amplificado pela reação de PCR, utilizando os seguintes iniciadores: M13 (universal) 5' CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' e M13 (reverse) 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'.

As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 10 µl, contendo 20 pM de cada iniciador, 0,25 mM de dNTPs, 0,1 unidade de Taq DNA polimerase (GIBCO BRL), 2 mM de MgCl₂ e 1 µl do tampão da enzima 10X concentrado (GIBCO BRL). A reação ocorreu em um aparelho termociclador “Mini-cyclerTM MJ Research”. O programa utilizado consistiu de: 1 ciclo de desnaturação de 95°C, durante 5 min., 30

ciclos de desnaturação de 95°C, durante 1 min., anelamento a 60°C durante 45 segundos, extensão a 72°C, durante 3 min.

Após a reação, todo o volume da mesma foi aplicado em gel de agarose a 1%, sendo a corrida eletroforética analisada e documentada como descrito no item 3.1.1.

Confirmada a presença do inserto, a colônia correspondente foi inoculada em 5 ml de meio LB, suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e incubada sob agitação constante durante 18 horas a 37°C.

O DNA plasmidiano foi extraído através da técnica de lise alcalina, utilizando-se o “Kit” comercial “Wizard Mini Prep” (Promega). A concentração do DNA plasmidiano obtido foi realizado como descrito no item 3.1.

3.1.6. Confirmação do tamanho do inserto através de digestão enzimática das construções intermediárias

Em seguida, as construções intermediárias pTOPO:SEC:GroEL e pTOPO:CYT:GroEL foram digeridas com as enzimas de restrição *Nsi*I e *Hpa*I para liberação do inserto (~1,6 Kb). As condições de reação foram as mesmas recomendadas pelos fabricantes.

3.1.7. Resolução eletroforética e purificação do inserto

Os DNAs plasmidianos digeridos foram acrescidos de 1:10 do volume de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,5%, glicerol 25%) foram depositados em gel de agarose a 1%, em tampão TAE 1X (Tris base 40 mM pH 7,2, NaOAc 20 mM, EDTA 1 mM),

contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml). As corridas eletroforéticas foram realizadas a 100 V durante, aproximadamente, uma hora. O DNA foi visualizado em gel sobre um transiluminador de luz ultravioleta (320 nm). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder (GIBCO BRL).

As bandas correspondentes ao gene *GroEL* foram recuperados do gel como descrito no item 3.1.3.

3.2. Sub-clonagem nos vetores que permitem a expressão da proteína no citoplasma (pVE3702), secretado no meio extracelular (pVE3684) e ancorada a parede celular (pVE3719)

3.2.1. Digestão enzimática dos vetores pVE3702, pVE3684 e pVE3719

Os vetores pVE3702, pVE3684, pVE3719 foram digeridos com as enzimas *NsiI* e *EcoRV* para a excisão do gene *nuc*. As condições da reação foram as mesmas recomendadas pelos fabricantes. Os DNAs plasmídianos digeridos foram resolvidos em gel de agarose 1% como descrito no item 3.1.7. A recuperação das bandas correspondentes aos vetores sem o *nuc* foram realizadas conforme descrito no item 3.1.3.

3.2.2. Obtenção de *E. coli* eletrocompetentes e eficiência de transformação

Uma colônia de *E. coli* TG1 foi inoculada em 10 ml de meio SOB e incubada durante 18 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm. Uma alíquota de 5 ml desta cultura

foi diluída em 500 ml do mesmo meio e incubada, sob as mesmas condições, até que a D.O de 0.2-0.25 fosse alcançada. A cultura foi então transferida para um banho de gelo durante 30 min e centrifugada durante 20 min a 8000 rpm e 4°C (centrífuga Sorvall T21, rotor SL250). A seguir, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 200 ml de glicerol 10% gelado e estéril. A suspensão bacteriana foi novamente centrifugada sob as mesmas condições e o precipitado ressuspenso em 200 ml de glicerol 10% gelado e estéril. Esse passo foi repetido mais uma vez e o precipitado foi ressuspenso em 100 ml de glicerol 10% gelado e estéril. No último passo, ressuspendeu-se o precipitado em 2 ml de glicerol 10% gelado e estéril. Alíquotas de 50 µl da suspensão bacteriana foram congeladas, utilizando-se uma mistura de gelo seco e metanol e foram estocadas à -70°C.

Para análise da eficiência de transformação, tubos com células eletrocompetentes, congeladas à -70°C, foram colocadas no gelo durante 5 min. Em seguida, adicionou-se, em dois tubos de células, 1 e/ou 10 ng de pUC18 e as misturas foram transferidas para cubetas de eletroporação, previamente resfriadas. Ambas amostras foram submetidas a um pulso de 2,5 V, capacitância 25 µFD e resistência de 200 Ω. Após o que acrescentou-se 950 µl de meio SOC a cada cubeta. A mistura foi transferida para um tubo de 2 ml e incubada a 37°C, durante 1 hora. Diluições de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ foram semeadas em meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 µg/ml), XGAL (40 µg/ml) e IPTG (0,04 mM) e incubadas a 37°C, durante 18 horas. Obtiveram-se 8 x 10⁹ unidades formadoras de colônia (UFC) por micrograma de DNA.

3.2.3. Ligação do gene *GroEL* nos vetores de expressão de *L. lactis*

Em seguida, os fragmentos purificados, contendo o gene *GroEL*, foram clonados nos vetores pVE3702, pVE3684, pVE3719 previamente digeridos. Foram utilizados 100 ng do vetor, 2 unidades de T4 DNA ligase (GIBCO BRL), 300 ng do gene *GroEL*, 2 µl de tampão de ligação 10X (GIBCO BRL) a 16°C, durante 18 horas, em um termociclador “Mini-cycler™ MJ Research”.

As misturas de ligação foram eletrotransformadas em *E. coli* e deram origem aos plasmídeos pCYT:*GroEL*, pSEC:*GroEL* e pSEC:LEISS:*GroEL*. Foi realizada a extração do DNA plasmidiano e as linhagens de *E. coli*, contendo as construções, foram congeladas a -70°C.

3.3. Eletrotransformação em *E. coli*

As misturas de ligação foram adicionadas as células eletrocompetentes, e foram, então, transferidas para cubetas de eletroporação, previamente resfriadas. As amostras foram submetidas a um pulso de 2,5 V, capacitância 25 µFD e resistência de 200 Ω. Foi acrescentado 950 ml de meio SOC a cada cubeta. A mistura foi transferida para um tubo de 2 ml e incubada a 37°C, durante 1 hora. Diluições de 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ foram semeadas em placas de Petri com meio LB ágar acrescido de cloranfenicol (10 µg/ml) e incubadas a 37°C, durante 18 horas.

3.4. Extração plasmidiana e sequenciamento das construções obtidas para confirmação da clonagem do gene *GroEL*

Colônias foram inoculadas em 5 ml de meio LB, suplementado com cloranfenicol (10 µg/ml) e incubadas sob agitação constante durante 18 horas, a 37°C. O DNA plasmidiano foi extraído como descrito no item 3.1. Em seguida, foi realizado o seqüenciamento para confirmação da clonagem e para verificar se houve alteração na fase da janela aberta de leitura (ORF) do gene *GroEL*. As reações de sequenciamento foram realizadas segundo o método de terminação de cadeia descrito por Sanger. Foram usados iniciadores fluorescentes e DNA polimerase termoresistente, seguindo as instruções do Kit “thermosequenaseTM Fluorescent labelled primer cycle sequencing with 7-deaza-dGTP (Amersham Biosciences).

O sequenciamento cíclico, baseado na reação de PCR, foi realizado em termociclador (Mini-cyclerTM, MJ Research). Os produtos do seqüenciamento foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% e 8 M de uréia em um seqüenciador automático de DNA (Automatic Laser Fluorescent Sequencer, A.L.F., Amersham Pharmacia). A corrida foi realizada a 1500 V, 45 mA, 34 W a 45°C durante 7 h. e os resultados do seqüenciamento armazenados na forma de cromatogramas processados automaticamente pelo aparelho, utilizando o programa ALFwin Sequence Analyser 2.0 (Amersham Pharmacia Biotech).

Em seguida, o DNA plasmidiano extraído foi transferido por eletroporação para a linhagem MG1363 de *L. Lactis*.

3.5. Obtenção de *L. lactis* eletrocompetentes

Uma colônia de *L. lactis* NZ9000 foi inoculada em 5 ml de meio M17 suplementado com 0,5% de glucose e incubada durante 18 horas a 30°C. Uma alíquota de 100 µl desta cultura foi diluída em 200 ml do mesmo meio e 22 ml de glicina a 20% incubada, sob as mesmas condições, até atingir a absorbância (600nm) = 0,5 – 0,8. A cultura foi então transferida para um banho de gelo e, em seguida, centrifugada durante 8 minutos a 8000 rpm e 4°C (centrífuga Sorvall T21, rotor SL250). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 200 ml de sacarose 0,5 M e glicerol 10% gelado e estéril e submetido às mesmas condições. Este passo foi repetido mais uma vez e o precipitado foi ressuspenso em 20 ml de sacarose 0,5 M e glicerol 10% estéril e gelado. No último passo, ressuspendeu-se o precipitado em 1 ml de polietilenoglicol 3000 (PEG3000) a 30% e glicerol 10% gelado. Alíquotas de 100 µl da suspensão bacteriana foram congeladas, utilizando uma mistura de gelo seco e metanol e foram estocadas a -70°C.

3.6. Eletrotransformação em *L. lactis*

100 µl de células NZ9000 de *L. lactis* eletrocompetentes foram descongeladas e deixadas no gelo por 5 a 7 min. Então, foi colocado 10 µl dos DNAs plasmídianos pCYT:*GroEL*, pSEC: *GroEL*, pLeiss: *GroEL* em cada tubo. As células eletrocompetentes e os DNAs plasmídianos foram deixados em contato durante 1 min. A mistura foi transferida para cubetas de eletroporação. As amostras foram submetidas a um pulso de 2,5 V, capacitância 25 µFD e resistência de 200 Ω. Após o pulso, a mistura

foi retirada da cubeta e foi adicionado 1 ml de M17 glu 0.5%. Em seguida, foi transferida para um tubo de 2 ml e incubada a 30° C, durante 3 horas. Diluições de 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ foram semeadas em placas de Petri com meio M17 glu Sac 0,5 M – amido – ágar / cloranfenicol.

4. Extração plasmidiana em *L. lactis*

Clones da bactéria *L. lactis* com fenótipo de resistência ao cloranfenicol foram selecionadas para confirmação da presença dos plasmídeos pCYT:*GroEL*, pSEC:*GroEL* e pLEISS:*GroEL*, cultivados em meio M17 glu 0.5% a 30°C, durante 18 horas. Em seguida, 2 ml de cada cultura foi centrifugada a 13000 rpm a 4°C por 5 min. e o sobrenadante eliminado. O precipitado foi ressuspenso em 100 µl da solução I (glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0 e lisozima 10 mg/ml) e incubado por 15 min a 30°C. Após o período de incubação, foram adicionados 200 µl da solução II (NaOH 0,2 M, SDS 1%) e misturados por inversão. Adicionaram-se 200 µl de clorofórmio e 150 µl da solução III (acetato de potássio a 3 M pH 4,8) e centrifugou-se a 13000 rpm a 4°C por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA precipitado com 2 volumes de etanol foi centrifugado a 13000 rpm a 4°C por 15 min. Em seguida, foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 30 µl de TE- Rnase. A quantificação do DNA foi realizada como descrito no item 3.1.1.

5. Extração de proteínas totais em *L. lactis*

Foi lançado um pré-inóculo das linhagens desejadas e as culturas foram crescidas a 30°C, durante 18 horas. Após este período, foi feita uma diluição de 1/50 das culturas. Ao atingirem a D.O de 0,4 – 0,5, as linhagens com o promotor P_{nisA} foram induzidas com nisina (1 ng/ml) durante três horas e aquelas com promotor P_{59} permaneceram em crescimento a 30°C, durante o mesmo período das culturas induzidas. Após esse período, foi medida a D.O das culturas e calculadas as quantidades das substâncias a serem usadas na extração da proteína em um programa do EXCEL (programa de fórmulas, montado em nosso laboratório, que calcula, a partir da D.O obtida, a quantidade de NaOH 60 mM (D.O x 75), DTT-LB (D.O x 75), TES-Lisozima (D.O x 200/ 3) e SDS 20% (D.O x 100/ 3) necessária para a extração das proteínas) . Para fracionamento das células, 2 ml de cada cultura foram centrifugados a 13000 rpm a 4°C, durante 5 min. Em seguida, foram separados e filtrados 1,4 ml do sobrenadante. A esse foram adicionados 100 µl de ácido tricloracético (TCA) 100% gelado, 15 µl de ditioeritritol (DTT, $C_F = 10$ mM) e 15 µl de fenilmetil sulfonil fluoride (PMSF, $C_F = 1$ mM) e, então, incubado durante 20 min no gelo. Após essa etapa, a mistura foi centrifugada por 10 min. a 13000 rpm a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensionado em NaOH 50 mM, em DTT-LB e em PMSF, $C_F = 1$ mM (segundo os valores pré-calculados pelo programa do EXCEL).

O precipitado celular foi ressuspensionado em TES-lisozima 10 mg/ml, em PMSF ($C_F = 1$ mM) e em DTT, $C_F = 10$ mM (segundo os valores pré-calculados pelo programa do EXCEL) e incubado durante 30 min a 37°C. Em seguida, foram adicionados SDS 20% e PMSF, $C_F = 1$ mM (segundo os valores pré-calculados pelo programa do EXCEL)

6. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra, contendo 2% de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 60 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 10% de glicerol, 1% de β -mercaptoetanol e 0,01% de azul de bromofenol e incubadas 5 min em água fervente. O gel de empilhamento foi feito a 4% e as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 %. Após a eletroforese, os géis foram corados pelo azul de Coomassie ou transferidos para a membrana de nitrocelulose.

7. "Western blot"

Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado sobre membranas de nitrocelulose e submetido a corrente constante de 40 mA a 4°C. Em seguida, a membrana foi bloqueada com 1% de BSA em 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM de NaCl e 0,5% de Tween 20. Após lavagens, a membrana foi incubada por 2h com anticorpo específico para o antígeno de interesse (anti-*L7/L12* ou anti-*GroEL*) numa diluição de 1:2000. Então, novamente, foi lavada e incubada por 45 min. com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina G de coelho acoplado à fosfatase alcalina. A membrana foi revelada em tampão, contendo 100 mM tris HCl, 100 mM NaCl e 5 mM $MgCl_2$, além de 3,3 mg/ml dos substratos BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-Toluidine salt) e NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride). A reação foi interrompida com H_2O destilada.

8. Expressão e purificação da proteína recombinante MBP:L7/L12 da *B. abortus* em *E. coli* para o uso como antígeno

8.1. Expressão da proteína MBP:L7/L12 da *B. abortus* em *E. coli*

O clone de *E. coli*, contendo a construção pMal:L7/L12, foi cultivado em 5 ml de meio LB + ampicilina (100µg/ml) durante 16 horas. No dia seguinte, o pré-inóculo foi transferido para 1 L de meio LB + ampicilina + 0,2% de glicose e crescido até atingir a absorbância de 0,5 – 0,6 a 600 nm. Para expressão da proteína de fusão MBP:L7/L12, neste momento, foram adicionados 0,4 mM de IPTG. Após 3 horas, as células bacterianas foram sedimentadas, através de centrifugação a 8.000 rpm, por 20 min. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em 100 ml de tampão fosfato (PBS, pH 8,4), contendo 25 mg de lisozima, congelado a -70°C e descongelado a 30°C. Esse processo foi repetido mais duas vezes. A suspensão resultante foi sonicada duas vezes por 30 segundos. Para separar as proteínas solúveis e insolúveis, a suspensão foi então centrifugada a 5000 rpm, durante 45 min. Uma amostra do sobrenadante e do sedimento foram analisados em gel de poliacrilamida a 12% para confirmar a presença da proteína recombinante e a sua solubilidade, como descrito no item 6.

8.2. Purificação da proteína de fusão MBP-L7/L12 pela cromatografia de afinidade em resina de amilose

Seringas de 60 ml foram utilizadas como colunas e a essas foram adicionadas 15 ml de resina de amilose. Essa resina foi lavada com 150 ml de tampão salina fosfato

(PBS) pH 7,3 e, em seguida, os lisados de *E. coli*, contendo a proteína de fusão MBP:L7/L12, foram diluídos 1:5 em PBS e transferidos para uma coluna calibrada para se obter um fluxo de aproximadamente 1 ml/min. A resina foi lavada novamente com 150 ml de PBS e a proteína de fusão eluída com uma solução de maltose a 10 mM. A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford.

9. Indução pela nisina do gene *L7/L12* da *B. abortus* clonado nos vetores de expressão em *L. lactis* e análise do crescimento das linhagens recombinantes de *L. lactis*

As linhagens recombinantes de *L. lactis*, contendo vetores com o gene *L7L12* foram rotineiramente crescidas em meio M17 glu 0,5% a 30°C, contendo antibiótico seletivo. As células em crescimento exponencial entre uma D.O. de 0,4 – 0,5 foram induzidas com o acréscimo de nisina (1 ng/ml). Uma hora após a indução, foi medida a D.O. de cada cultura, sendo 100 µl diluído seriadamente. As diluições (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) foram estriadas em placas com meio M17 glu 0,5% suplementado com o antibiótico e incubadas a 30°C, durante 24 horas para a formação de colônias. O procedimento anterior foi repetido a cada hora até 6 horas depois da indução. Após o período de 18 horas de incubação a 30°C das placas de Petri, foram realizadas as contagens das unidades formadoras de colônias e análise da relação entre D.O./ tempo de indução e UFCs formadas durante o período de indução.

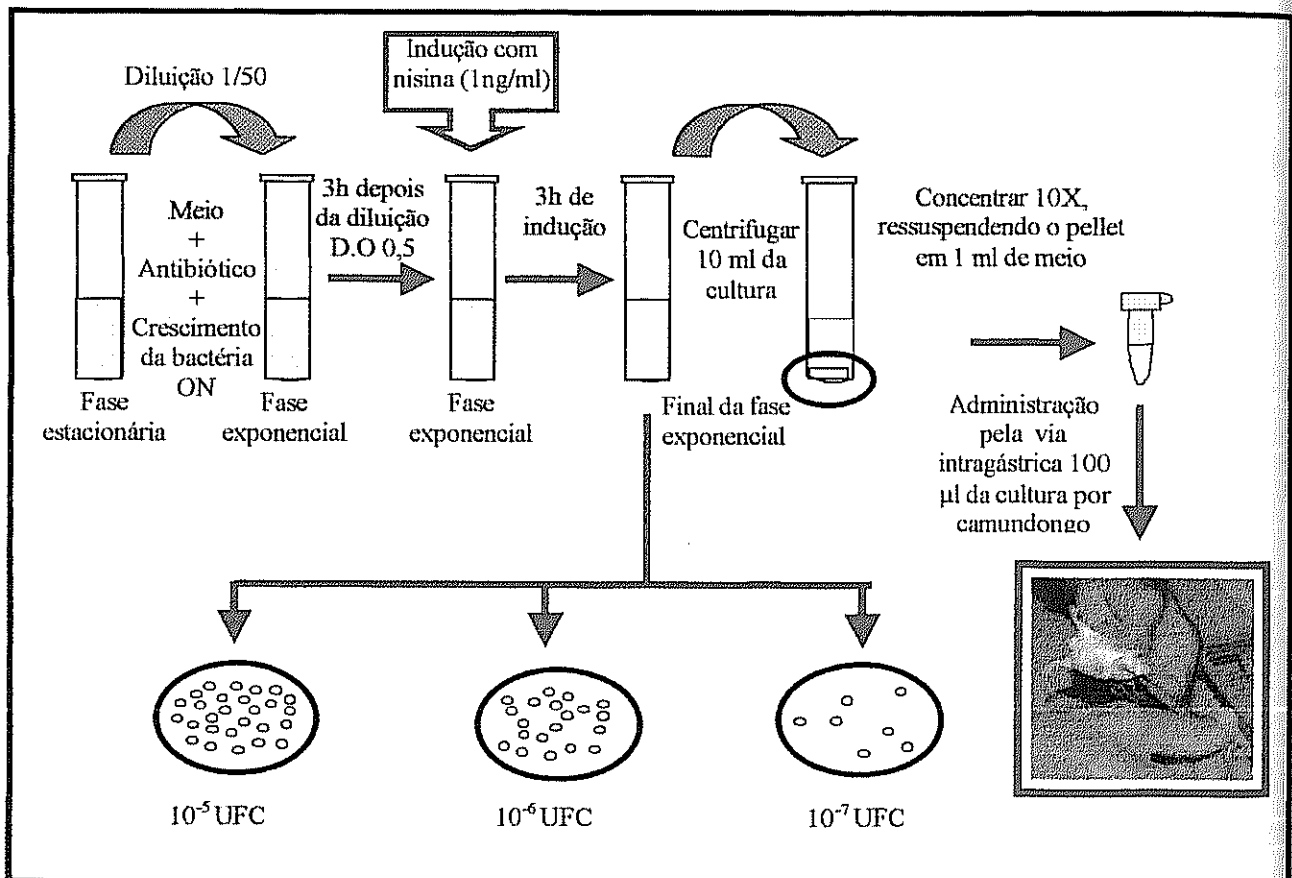


FIGURA 8: Esquema do protocolo de preparação das linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras do antígeno L7/L12 para as imunizações.

10. Animais experimentais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c, susceptíveis à infecção pela *B. abortus*, com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB/UFMG

11. Preparação das vacinas para imunização

As linhagens recombinantes de *L. lactis* foram crescidas a 30°C em meio M17, suplementado com 0,5% de glucose e com eritromicina a 5 µg/ml ou cloranfenicol a 5 µg/ml. As construções com o promotor P_{nisA}, ao atingirem a D.O. entre 0,4 – 0,5, foram induzidas com nisina, numa concentração final de 1 ng/ml, para a expressão da proteína L7/L12, durante o período de 3 horas. As construções com o promotor P₅₉ permaneceram incubadas a 30 ° C durante o mesmo período. Após este período, cada cultura foi concentrada 10x e ressuspensa em meio M17 suplementado com 0,5% de glicose. Os camundongos foram imunizados com 100 µl da cultura (10⁹ UFC) correspondente a cada grupo (FIG. 8).

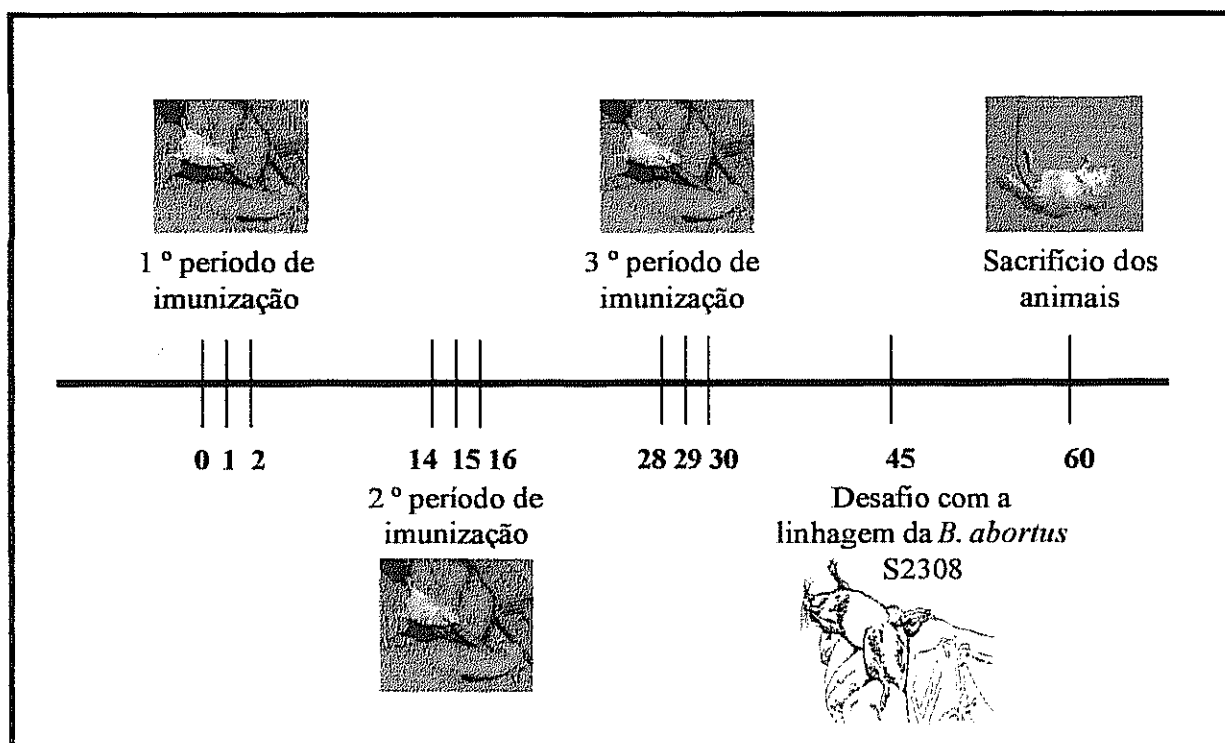


FIGURA 9: Cronograma das imunizações e provas de proteção utilizando linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras de L7/L12. As imunizações consistiram em três períodos de três dias consecutivos, com intervalo de 14 dias de um período para o outro (cronograma modificado, baseado com o estabelecido por Robinson *et al*, 1997). Quinze dias após o último período de imunização os animais foram infectados pela via intraperitoneal com 10^6 UFC da cepa selvagem 2308 de *B. abortus*. Duas semanas após o desafio, estes animais foram sacrificados para contagem de UFC de *B. abortus* S2308 presentes no baço dos camundongos.

12. Imunizações de camundongos BALB/c com linhagens recombinantes de *L. lactis* e a utilização de adjuvantes de mucosa

12.1 Imunizações utilizando linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras de L7/L12

Nos dias 0, 1, 2, 14, 15, 16, 28, 29 e 30, os grupos de camundongos BALB/c foram imunizados pela via intragástrica com as linhagens recombinantes de *L. lactis* (pCYT:L7/L12, pSEC:L7/L12 e pANC:L7/L12), expressando o antígeno L7/L12 (FIG. 9). Cada animal foi vacinado com uma dose de 10^9 UFC em 100 μ l de cultura. Os grupos utilizados como controles negativos receberam PBS ou a linhagem pVE3655.

12.2. Imunização em associação com linhagem recombinantes de *L. lactis* produtora da interleucina-12

Os camundongos foram imunizados com a linhagem pCYT:L7/L12, em associação com as linhagens recombinantes de *L. lactis*, produtoras de IL-12 (LBH163 e LBH153), utilizadas como adjuvantes de mucosa. Cada camundongo foi vacinado com 100 μ l (10^9 UFC) de cada uma das culturas. Como controle negativo, um grupo foi vacinado apenas com 100 μ l da linhagem recombinante de *L. lactis* produtora da IL-12 (LBH163).

12.3. Imunização em associação com a linhagem probiótica de *Lb. delbrueckii*

Os camundongos foram imunizados com a linhagem de *L. lactis* pCYT:L7/L12 em associação com a linhagem *Lb. delbrueckii*. Como controle negativo um grupo foi vacinado apenas com a linhagem de *Lb. delbrueckii*.

A linhagem de *Lb. delbrueckii* foi crescida a 37°C em meio MRS durante 20 horas e então concentrada 10x e ressuspensa em 1 ml de meio MRS. Nos períodos de imunização, foi administrada por via intragástrica 100 µl (10⁹ UFC) da cultura de *Lb. delbrueckii* e 100 µl (10⁹ UFC) da cultura da linhagem pCYT:L7/L12, por camundongo.

Estes grupos foram imunizados, durante 7 dias consecutivos e anteriores aos períodos de imunização, apenas com 100 µl (10⁹ UFC) da linhagem *Lb. delbrueckii* (Neumann *et al*, 1998) e durante os períodos de imunização associados a linhagem de *L. lactis* pCYT:L7/L12.

12.4. Imunização em associação com o adjuvante de mucosa LT(R192G)

Este material foi gentilmente cedido pelo Prof. John D. Clements, Ph.D da “Tulane University Health Sciences Center” (New Orleans, Louisiana, USA).

Uma mg de LT(R192G) em TEAN (0,05 M Tris, 0,001 M EDTA, 0,003 M NaN₃, 0,2 M NaCl, pH 7.5) foi ressuspenso em 1 ml de água destilada. Aliquotas de 25 µl, correspondente a 25 µg de LT, foram estocadas a 4°C e administradas associadas à linhagem recombinante pCYT:L7/L12 de *L. lactis*. por camundongo, nos períodos de imunização.

12.5. Imunização com a linhagem S19 da *B. abortus*

Como controle positivo para todas as imunizações, um grupo foi injetado via intraperitoneal com 5×10^4 UFC da linhagem S19 da *B. abortus* (linhagem vacinal).

13. Coletas de sangue

As coletas de sangue foram realizadas nos dias 14, 28 e 42 após o primeiro dia de imunização. O sangue foi retirado do plexo retro-orbital dos camundongos e, após sua coagulação, centrifugado a 13000 rpm, por 8 min., para obtenção dos soros. Estes foram estocados a -70°C até serem utilizados.

14. Coleta de fezes

Coletas de fezes foram feitas nos dias 15, 24 e 38 após o primeiro dia de imunização. Uma amostra de 0,1 g de fezes foi coletada de cada camundongo e adicionado a 1 ml de PBS, contendo 1% de BSA e 1mM de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) e incubado a 4°C , "overnight". No dia seguinte, as amostras foram homogeneizadas por 30 min no vórtex e centrifugadas a 13000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi removido e estocado a -70°C (Robinson *et al*, 1997).

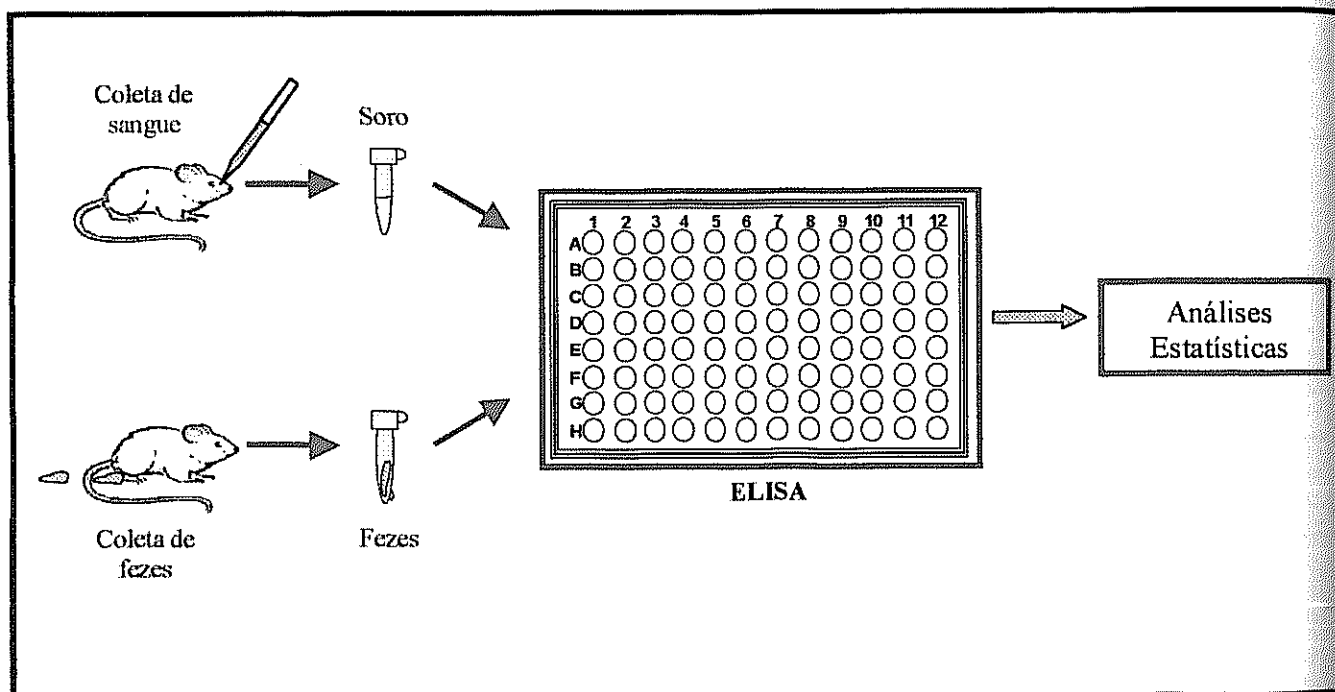


FIGURA 10: Representação esquemática da detecção de anticorpos L7/L12-específicos nas fezes e no soro.

15. Análise da resposta imune humoral

15.1. ELISA para detecção de anticorpos antígeno- específico no soro e nas fezes

As placas foram sensibilizadas com 1µg/mL da proteína L7/L12 purificada em tampão carbonato/bicarbonato a 4°C "overnight". Em seguida, os poços das placas de ELISA foram bloqueados por 2h, à temperatura ambiente com PBS, contendo 0.1% de Tween 20 mais 1% de BSA. O próximo passo foi aplicar 100 µL de cada amostra de soro na diluição 1:100 em PBS Tween 20 ou 100 µL do sobrenadante das fezes para formação do complexo antígeno- anticorpo. As placas com soro permaneceram incubadas a 37°C, durante 2h, enquanto as placas com as amostras fecais foram incubadas a 4°C "overnight". Após essas etapas, foram realizadas lavagens das placas para retirada dos anticorpos não ligados ao antígeno e foram adicionadas antiglobulina e anti-IgG de camundongo conjugada com a peroxidase (1:1000, Promega) nas placas que continham amostras de soro e antiglobulina, anti-IgA de camundongo, conjugada com a peroxidase (1:1000, Sigma) nas placas que continham amostras fecais. Após 1h, foram feitas lavagens das placas e revelação por adição de o-phenylenediamine (Sigma) e peróxido de hidrogênio. A reação foi parada com a adição de uma solução de 5% de ácido sulfúrico. A leitura das placas foi realizada utilizando-se espectrofotômetro em absorbância no comprimento de onda de 492 nm (FIG. 10) (Biorad, Hercules, CA).

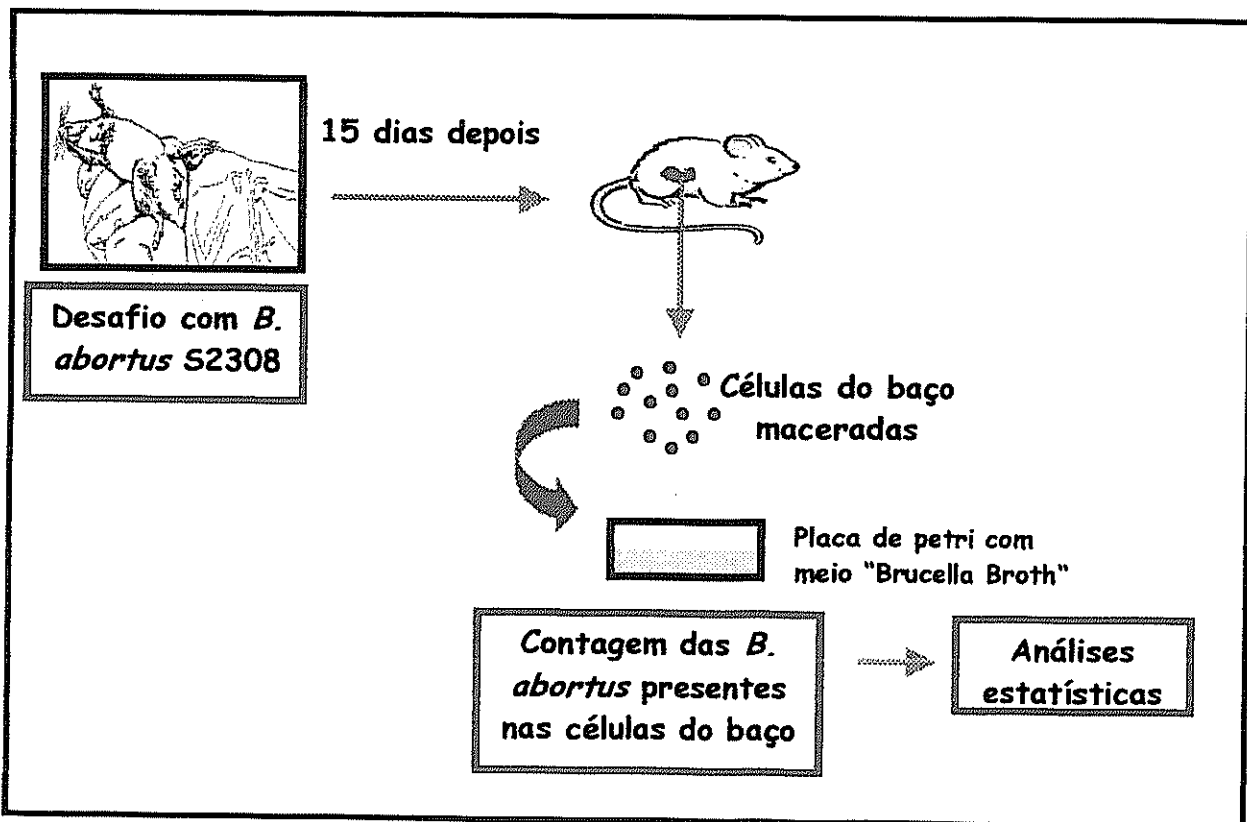


FIGURA 11: Determinação do nível de imunoproteção.

16. Análise de proteção após o desafio

Quinze dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados pela via intraperitoneal com 10^6 UFC da linhagem virulenta 2308 da *B. abortus*. Duas semanas após o desafio, os animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical. O baço foi removido de cada camundongo, macerado e homogenizado separadamente em PBS estéril. Em seguida, 1 ml do homogenizado foi retirado e diluído seriadamente de 10^{-1} a 10^{-5} e 0,1 ml de cada diluição foi semeada em placas de *Brucella* ágar (DIFCO). As placas foram incubadas por três dias a 37°C , e o número de UFC da *B. abortus* foi determinado para cada animal. Os resultados foram apresentados em log UFC para cada grupo. O procedimento está ilustrado na figura 11.

17. Análises estatísticas dos dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste-t de “student” através do programa de computador MINITAB (Minitab Inc., State College, PA). A significância da resposta imune e as unidades logarítmicas de proteção foram obtidas subtraindo-se o valor da D.O. ou da UFC dos grupos controles correspondentes, respectivamente e foram consideradas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *L. lactis* é o modelo das BAL e possui um grande número de instrumentos genéticos que facilitam o trabalho com esse microrganismo. Essa bactéria não patogênica, possui vários sistemas de expressão que foram desenvolvidos para a produção de diferentes proteínas heterólogas. Além disso, sua preparação é de baixo custo, o que facilita a realização de testes para se avaliar se as linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras de antígenos, podem ou não serem utilizadas como novas vacinas (Wells & Pozzi, 1997). Considerando esses fatores, escolhemos o sistema de expressão de proteínas heterólogas em *L. lactis*, desenvolvido no laboratório do Dr. Phillippe Langella (França), para ser utilizado no projeto CAPES/COFECUB 319-II, que tem como um de seus objetivos testar um novo sistema de vacinação que possa ser usado para o controle da brucelose. O presente trabalho de dissertação inclui-se nesse projeto.

Vários antígenos da *Brucella* já foram descritos e caracterizados, alguns são capazes de induzir respostas imunes celulares como os antígenos UvrA, GAPDH, YajC e várias proteínas de choque térmico (Rosinha *et al.*, 2002a; Oliveira *et al.*, 2002). No começo do projeto, foram escolhidos os antígenos L7/L12, GroEL, HtrA e DnaK da *B. abortus* para serem expressos no sistema de expressão, desenvolvido em *L. lactis* pelo grupo francês. Escolhemos trabalhar com a proteína ribossomal L7/L12 por ser a mais bem caracterizada imunologicamente e pela sua capacidade de induzir uma resposta imune protetora (Oliveira & Splitter, 1996) e as proteínas de choque térmico por estarem envolvidas em respostas imunes celulares, essenciais para a proteção do hospedeiro contra a infecção da *B. abortus* (WHO, 1998; Oliveira *et al.*, 2002).

Linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras das proteínas ribossomal L7/L12 (Ribeiro *et al.*, 2002a) e de choque térmico GroEL da *B. abortus* foram construídas com o intuito de serem testadas como vacinas contra a brucelose experimental.

1. Ensaio de imunização contra a brucelose experimental, utilizando linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras da proteína L7/L12 da *B. abortus*

As linhagens recombinantes de *L. lactis*, expressando L7/L12, foram construídas em um sistema que permite a produção eficiente de proteínas heterólogas (Poquet *et al.*, 1998; Le Loir *et al.*, 1998-2001) e o endereçamento dessas proteínas para três localizações celulares diferentes: citoplasma, secretada ou ancorada à parede celular (Ribeiro *et al.*, 2002 a). A produção da proteína em diferentes compartimentos celulares é interessante, uma vez que a indução de uma resposta imune protetora irá depender do antígeno, do vetor de apresentação do mesmo e ainda da sua localização celular (Norton *et al.*, 1994).

1.1. Produção da proteína L7/L12 da *B. abortus* nas linhagens recombinantes de *L. lactis*

Para testar o potencial das linhagens recombinantes de *L. lactis*, produtoras do antígeno L7/L12, como vacinas vivas contra a brucelose experimental, o primeiro passo foi reproduzir em nosso laboratório (LGCM) os resultados obtidos por Ribeiro e colaboradores (2002a). Desse modo, foram investigados, através de ensaios de “western blot”, o nível de produção e a localização da proteína L7/L12 nas linhagens construídas

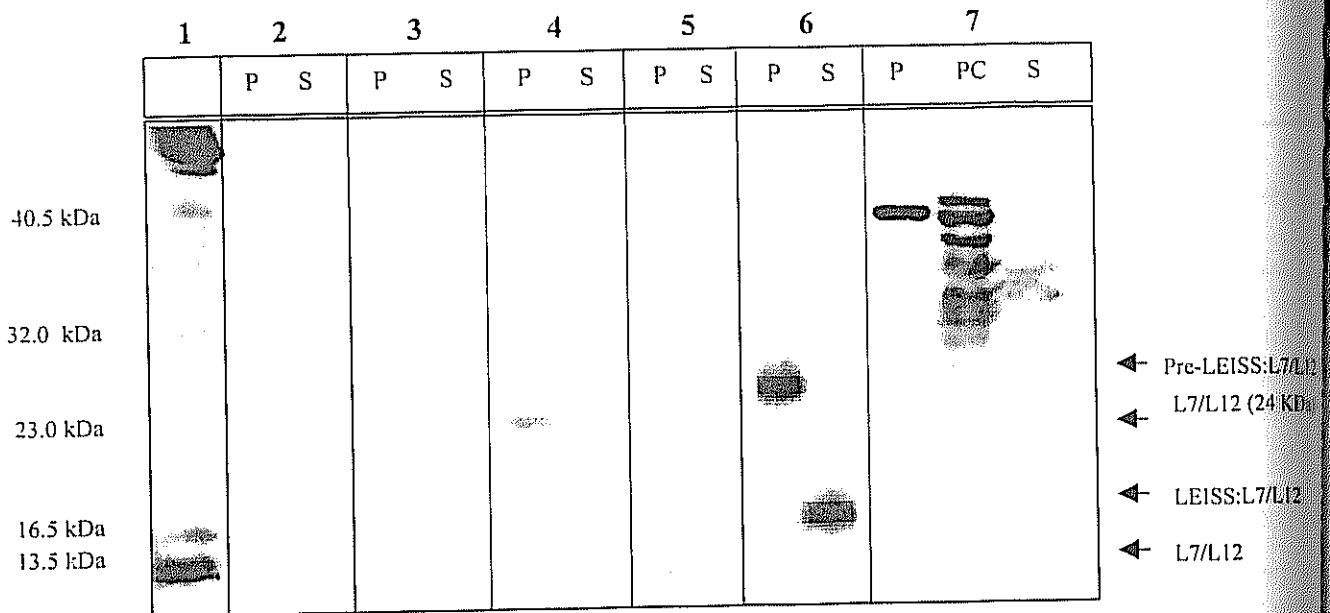


FIGURA 12: Análise da produção da proteína L7/L12 nas linhagens recombinantes de *L. lactis* através da técnica de "western blot". Coluna 1: Digestão com o fator Xa da proteína de fusão MBP/L7/L12. Coluna 2: linhagem pVE3655 (controle negativo), induzida pela nisina. Colunas 3 e 4: pCYT:L7/L12 (forma citoplasmática), não induzida e induzida pela nisina, respectivamente. Colunas 5 e 6: linhagem pSEC:LEISS:L7/L12 (forma secretada) não induzida e induzida pela nisina, respectivamente. Coluna 7: pANC: L7/L12 (forma ancorada na parede celular), induzida pela nisina. Frações do extrato celular (P), do sobrenadante (S) e da parede celular (PC). Imunodeteção realizada com anticorpos anti-L7/L12.

com o promotor induzido pela nisina (P_{nisA}): pCYT:L7/L12 (forma citoplasmática), pSEC:LEISS:L7/L12 (forma secretada) e pANC:L7/L12 (forma ancorada). A linhagem de *L. lactis* pVE3655, que possui o vetor parental, desprovido de proteínas recombinantes, foi utilizada como controle negativo. Também foram utilizadas, como controles, culturas não induzidas das mesmas linhagens. Desse modo, foi possível confirmar se o indutor estava funcionando normalmente e se os anticorpos estavam se ligando especificamente ao antígeno L7/L12 da *B. abortus* e não na L7/L12 ou em outras proteínas ribossomais do *L. lactis*. Na figura 12, estão representados os resultados do “western blot” que confirmam a produção de L7/L12 nas formas: citoplasmática, secretada e ancorada, comprovando os resultados obtidos por Ribeiro et al. (2002a). Na cultura da linhagem pCYT:L7/L12 induzida, pode-se observar um baixo nível de expressão da proteína L7/L12 no citoplasma, com peso molecular de aproximadamente 24 kDa, correspondente ao dobro do peso molecular real da proteína (12 kDa). Os autores tentaram explicar esse fenômeno, levantando a hipótese de ter ocorrido uma migração aberrante da proteína ou a formação de um dímero deste polipeptídeo. Na forma ancorada, pode-se observar a presença de várias bandas, próximas umas das outras, da proteína fusionada L7/L12:CWA_{M6} na fração da parede celular. Esse padrão de bandas é característico de proteínas ancoradas e é atribuído à proteólise que ocorre na superfície celular. A reprodução desses resultados comprovou que as linhagens recombinantes de *L. lactis* construídas, utilizando-se o sistema NICE de expressão, são estáveis e capazes de produzir eficientemente a proteína L7/L12 *in vitro* e endereçá-la para compartimentos celulares diferentes.

Também foi testada, pela primeira vez, a capacidade de expressão e produção da proteína L7/L12 das linhagens construídas com o promotor constitutivo P_{39} . Essas

linhagens possuíam o gene *L7/L12*, clonado sob o controle do promotor constitutivo P_{59} , sendo a proteína endereçada para o citoplasma (pCYT₅₉: L7/L12) e para o meio extracelular (pSEC₅₉: L7/L12). Para analisar a produção, extratos protéicos dessas linhagens fracionadas em lisado total, foram utilizados na realização do “western blot”. A forma citoplasmática, na fração celular, pode ser observada como uma banda protéica específica (12kDa). Contudo, era esperado detectar uma banda de 24 kDa como a encontrada com pCYT:L7/L12 sob o controle do promotor P_{msA} . Esses resultados não fornecem subsídios para explicar a migração aberrante da proteína e para concluir o porque da ocorrência de formação de um dímero da proteína, visto que esses promotores possuem forças praticamente idênticas. A proteína recombinante L7/L12 também foi sintetizada na forma secretada, sendo a eficiência de secreção do polipeptídeo de 77%, enquanto na linhagem com o P_{msA} (pSEC:L7/L12) foi de aproximadamente 35% (Ribeiro *et al.*, 2002b).

Comparando as formas citoplasmáticas e secretadas, utilizando-se os dois promotores P_{msA} (induzido) e P_{59} (constitutivo) para expressão do gene *L7/L12*, foi demonstrado que a produção da proteína nessas linhagens foi praticamente equivalente. No entanto, analisando-se as formas secretadas, nota-se que existe uma diferença significativa na eficiência de secreção das mesmas. Atribuímos a esse fenômeno, o fato de que no sistema de expressão constitutivo, a proteína L7/L12 está constantemente sendo produzida e secretada, enquanto no sistema de expressão induzido, a proteína é produzida em grandes quantidades, imediatamente após a indução, durante um determinado período, e o maquinário de secreção da célula não consegue secretar toda a quantidade produzida de L7/L12. Esses resultados estão apresentados, em anexo, no artigo publicado pelo nosso grupo (Ribeiro *et al.* 2002b).

TABELA 7: Estudos utilizando as BL como vacinas vivas

BL utilizada como vetor	Antígeno heterólogo	Via de administração	Dose administrada	Resposta imune antígeno-específica	Referência
<i>L. lactis</i>	TTFC	subcutânea	5 X 10 ⁹ / 5 X 10 ⁷ / 5 X 10 ⁸	IgG (soro)	Norton <i>et al.</i> , 1996
<i>L. lactis</i>	TTFC	intragástrica	5 X 10 ⁹	IgG (soro) IgA (fezes)	Robinson <i>et al.</i> , 1997
<i>L. lactis</i> <i>Lb. plantarum</i>	TTFC	intragástrica	10 ⁹	IgG (soro)	Grangette <i>et al.</i> , 2002
<i>Lb. casei</i>	PA	intragástrica nasal	5 X 10 ¹⁰ / 10 ⁹ (oral) 2X10 ⁹ /4X10 ⁷ (nasal)	IgG (soro)	Zegers <i>et al.</i> , 1999
<i>Lb. paracasei</i>	HIV V3, gp41	intragástrica nasal	10 ⁹	sem resposta	Mercenier <i>et al.</i> , 1996
<i>Lb. plantarum</i>	TTFC	nasal	10 ⁹	IgG (soro) IgA (lavagens pulmonares)	Grangette <i>et al.</i> , 2001
<i>Lb. plantarum</i>	TTFC	subcutânea intragástrica nasal	10 ⁹	IgG (soro) IgA (lavagens pulmonar/ fezes)	Reveneau <i>et al.</i> , 2002
<i>S. gordonii</i>	E7 (HPV-16)	subcutânea	5 X 10 ⁸	IgG (soro)	Pozzi <i>et al.</i> , 1992
<i>S. gordonii</i>	LBT	subcutânea intragástrica	10 ⁹	IgG (soro- subcutânea/ oral) IgA (fezes- intragástrica)	Ricci <i>et al.</i> , 2000
<i>S. gordonii</i>	TTFC	subcutânea nasal	10 ⁹	IgG (soro - subcutânea/ nasal) IgA (lavagens pulmonares)	Medaglini <i>et al.</i> , 2001
<i>S. mutans</i>	PAC	intragástrica	10 ⁹	IgG (soro) IgA (saliva)	Iwaki <i>et al.</i> , 1990

1.2. Determinação da dose da vacina a ser administrada pela via intragástrica

Para o desenvolvimento de uma resposta imune local, após a administração intragástrica de BAL recombinantes produtoras de antígenos heterólogos, é preciso considerar a quantidade do antígeno produzido, a persistência da bactéria no trato gastrointestinal e a quantidade dessa bactéria a ser administrada (Mercenier *et al*, 2000). A produção de proteínas heterólogas parece ser dependente do metabolismo das bactérias durante a passagem ou colonização do trato gastrointestinal. As condições encontradas pelas BAL são adversas e devem ser levadas em consideração em qualquer estudo. A acidez do estômago e a secreção pancreática são fatores que afetam a viabilidade das BAL durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (Corthier *et al.*, 1997 e 1998). Estudos recentes demonstraram que a magnitude da resposta imune também depende da dose de BAL administrada. Camundongos que receberam dieta baseada em leite acrescido de 10^{11} UFC de *Lb. rhamnosus* HN001 apresentaram uma atividade fagocítica maior do que os animais que receberam 10^7 e 10^9 bactérias (Gill *et al.*, 2000). Desse modo, com o objetivo de estabelecer a dose vacinal ideal, para administração intragástrica das linhagens recombinantes de *L. lactis*, utilizadas neste trabalho, diversos experimentos que utilizaram BAL como vetor de apresentação de antígenos nas mucosas foram comparados (TAB. 7). A dose geralmente administrada é de aproximadamente 10^9 UFC e assim, baseado nesses trabalhos, foi estabelecido que esta seria a dose utilizada para vacinação dos camundongos nos nossos experimentos.

Curvas de crescimento foram realizadas com as linhagens de *L. lactis* produtoras da proteína L7/L12 da *B. abortus* nas três diferentes localizações celulares: citoplasma (pCYT:L7/L12), meio extracelular (pSEC:LEISS:L7/L12) e ancorada à parede celular

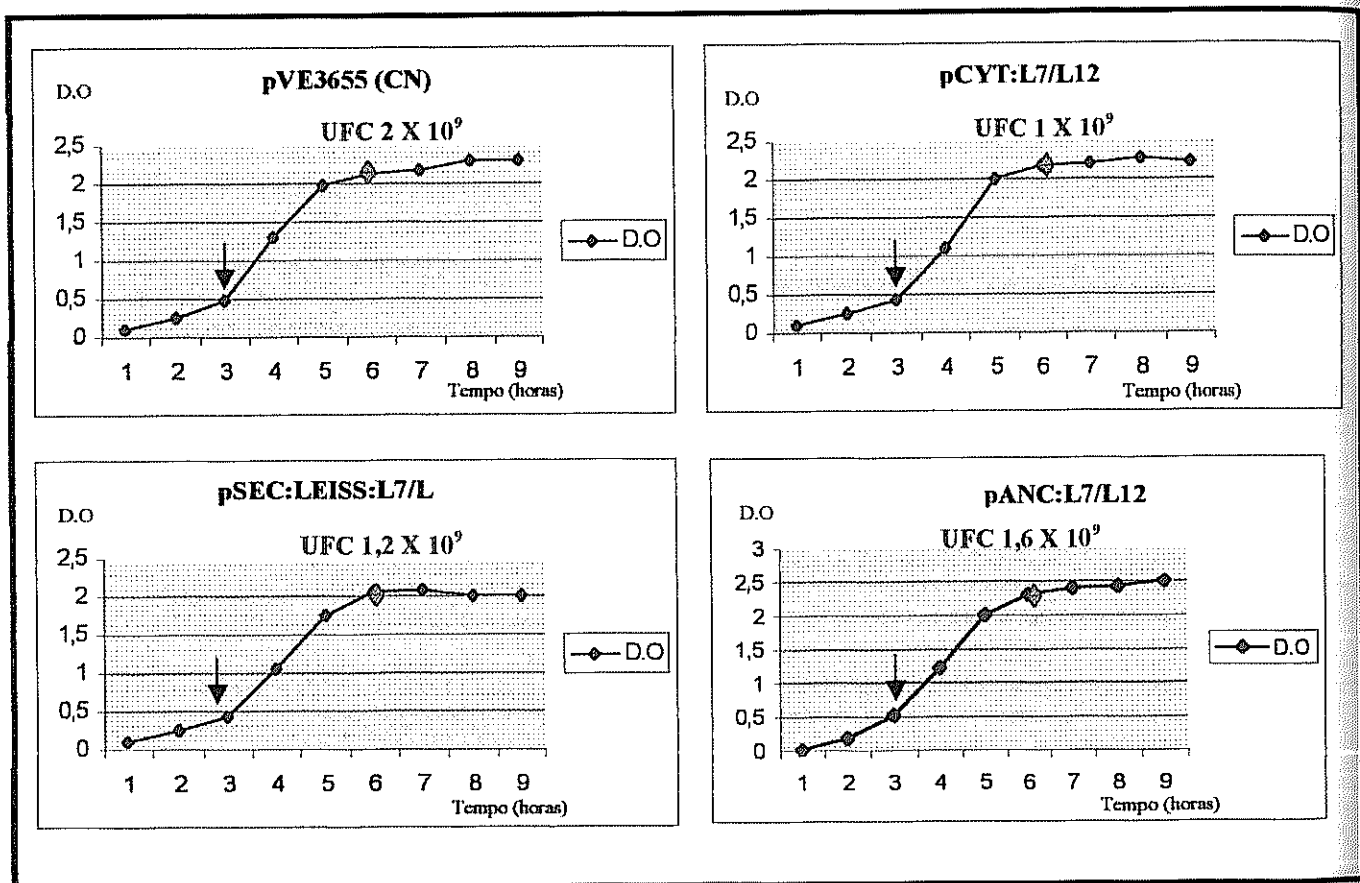


FIGURA 13. Curvas de crescimento das linhagens recombinantes de *L. lactis*. Os gráficos representam a curva de crescimento das linhagens pVE3566 (controle negativo-CN), pCYT:L7/L12 (produção da proteína L7/L12 no citoplasma), pSEC:LEISS:L7/L12 (secreção da proteína L7/L12) e pANC:L7/L12 (a proteína L7/L12 ancorada a parede celular) induzidas pela nisina. A seta indica o momento da indução e \diamond indica o momento que as linhagens atingem 1×10^9 UFC.

(pANC:L7/L12) e na linhagem de *L. lactis* pVE3655 utilizada como controle negativo. Assim, o período de indução necessário para chegar a uma UFC de 10^9 foi determinado. Suspensões de cada linhagem bacteriana foram induzidas ($D.O_{600}$, entre 0,4 e 0,5) e, alíquotas da suspensão bacteriana foram retiradas a cada hora, diluídas seriadamente e plaqueadas. As UFC foram determinadas e as curvas de crescimento obtidas estão representadas na figura 13. Pode-se observar, nas curvas, que três horas após a indução, atinge-se a magnitude de aproximadamente 1×10^9 UFC/ml. Então, determinou-se que seria necessário esperar esse período, para alcançar a dose desejada. Apesar do indutor utilizado ser a nisina, um peptídeo antimicrobiano, a quantidade utilizada para induzir a expressão (1ng/ml) não afetou o crescimento das bactérias. Dessa forma, a partir de culturas concentradas 10 X, inóculos de até 10^{10} UFC/ml puderam ser facilmente preparados, para que doses de 10^9 UFC (100 μ l), fossem administradas por camundongo, a cada vacinação. No período das vacinações, frações das culturas foram recolhidas para confirmação da produção de L7/L12 da *B. abortus*, pelas linhagens de *L. lactis*, através da técnica de "western blot". Esse passo foi realizado para verificar se ocorreu a produção da proteína e para certificar se a proteína alvo estava realmente sendo administrada aos camundongos.

Os sistemas de expressão induzidos apresentam a vantagem de permitir a maximização da produção de proteínas heterólogas (Kuipers *et al.*, 1997). Essa característica permite que sejam gerados inóculos vacinais enriquecidos na fração imunogênica. Entretanto, através do "western blot", foi demonstrado que a produção da proteína L7/L12 permaneceu constante e estável durante seis horas após as três horas de indução. No entanto, como esta se manteve estável, conseguimos obter a dose desejada para as imunizações dos camundongos.

1.3. Ensaio piloto de imunização

Após o estabelecimento das condições ideais de crescimento, para obtenção da dose desejada, descritas acima, foi realizado um primeiro experimento piloto de imunização com as linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras da proteína ribossomal L7/L12 em localizações celulares diferentes: citoplasma (pCYT:L7/L12), meio extracelular (pSEC:LEISS:L7/L12) e ancorada à parede bacteriana (pANC:L7/L12). Nesse ensaio, essas linhagens foram testadas como vacinas vivas administradas pela via intragástrica. Como controles foram utilizados, um grupo de animais vacinado apenas com PBS, outro com a linhagem de *L. lactis*, pVE3566, que não produz a proteína L7/L12 (controle negativo) e um terceiro grupo vacinado com a linhagem S19 da *B. abortus* (controle positivo). A construção e escolha dessas linhagens, para um primeiro experimento de imunização, estão relacionadas ao fato da resposta imune protetora depender tanto da quantidade de antígeno produzida como também da sua forma de apresentação (Norton *et al*, 1996).

O objetivo desse experimento piloto foi analisar se era possível a indução de uma resposta imune, em camundongos BALB/c, através da administração intragástrica dessas linhagens e verificar qual delas seria a mais imunogênica.

1.3.1. Indução da resposta imune de mucosa anti-L7/L12 pela via intragástrica

A resposta imune protetora contra infecções, através das mucosas, depende fortemente da produção de IgA. A IgA exerce um papel fundamental na imunidade das mucosas e pode ser eficientemente secretada através do epitélio sendo, em seguida,

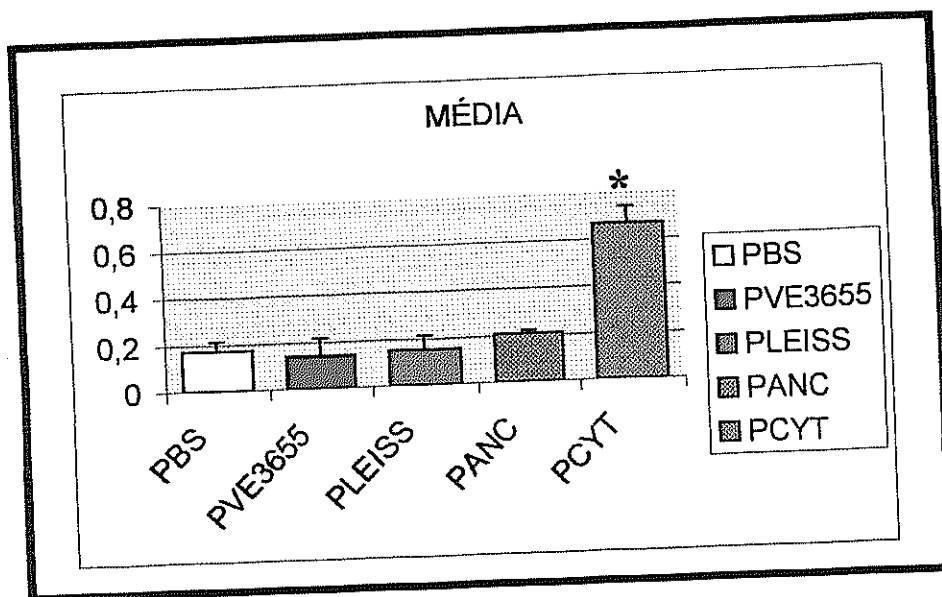


FIGURA 14: Análise da resposta humoral de mucosa após dosagem de IgA anti-L7/L12 nas fezes dos camundongos BALB/c vacinados pela via intragástrica com linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras da proteína L7/L12 da *B. abortus*. Os anticorpos L7/L12-específicos foram medidos nas fezes coletadas no dia 15 através da técnica de ELISA. Os valores apresentados representam a média do grupo de três camundongos. * indica a indução significativa de IgA anti-L7/L12 do grupo vacinado quando comparado com os controles negativos: animais que receberam apenas PBS ou *L. lactis* pVE3655.

transportada para a superfície das mucosas (Macpherson *et al.*, 2001). Dessa forma, para verificar a existência de uma resposta imune de mucosa, extratos fecais frescos foram coletados dos camundongos dos grupos imunizados com as linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras de L7/L12 da *B. abortus* (pCYT:L7/L12, pSEC:LEISS:L7/L12, pANC:L7/L12) pela via intragástrica, foram analisados pela técnica de ELISA, específica para detecção de IgA, e comparados com os grupos controles.

Os camundongos vacinados com a linhagem que produz a proteína L7/L12 no citoplasma (pCYT:L7/L12) apresentaram uma resposta humoral IgA anti-L7/L12 específica quando comparados com os grupos controles. Esse grupo, 15 dias após o primeiro período de imunização, apresentou uma alta produção de IgA, enquanto que, os grupos vacinados com as linhagens que produzem L7/L12 na forma secretada (LEISS:L7/L12) e ancorada à parede celular (pANC:L7/L12) não apresentaram níveis significativos de IgA anti-L7/L12 (FIG. 14).

A forma citoplasmática é a mais citada como indutora de resposta imune e proteção (Wells *et al.*, 1993a; Norton *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1997; Grangette *et al.*, 2002; Reveneau *et al.*, 2002). Norton e colaboradores (1996) verificaram que o antígeno heterólogo, TTFC, quando produzido no citoplasma em grandes quantidades, é capaz de induzir uma resposta imune humoral mais eficiente e níveis de proteção mais elevados (Wells *et al.*, 1993 a; Norton *et al.*, 1996; Grangette *et al.*, 2002; Reveneau *et al.*, 2002). Esse fato, provavelmente, deve estar associado à capacidade do *L. lactis* de proteger os antígenos que estão no seu interior de possível degradação no trato gastrointestinal (Wells *et al.*, 1995). Outro fato interessante é que a forma citoplasmática pode induzir altos níveis de anticorpos antígeno-específico e não induzir uma alta resposta imune contra as proteínas do próprio *L. lactis*. Assim como

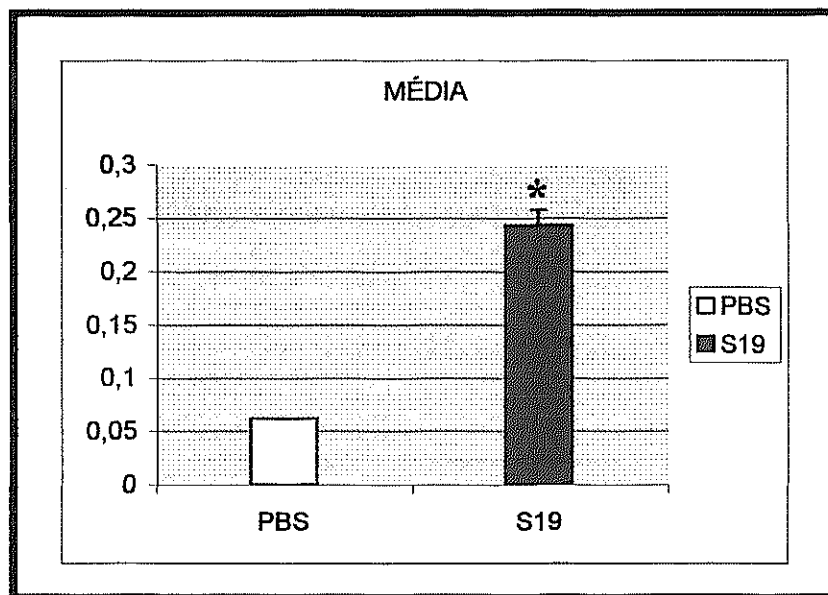


FIGURA 15: Detecção de IgG anti-L7/L12 nos camundongos vacinados pela via intraperitoneal com a linhagem vacinal S19 da *B. abortus*.

micropartículas e lipossomos, essa bactéria constitui um sistema imunologicamente silenciado para carrear antígenos (Norton *et al.*, 1996).

Nenhuma resposta específica significativa de IgG anti-L7/L12 foi detectada no soro dos animais imunizados pela via intragástrica, quando comparados com os grupos controles, com a exceção do grupo imunizado com a linhagem S19 (controle positivo). Quinze dias após a administração de 10^6 UFC dessa linhagem vacinal da *B. abortus*, níveis significativos de IgG anti-L7/L12 foram detectados no soro dos camundongos (FIG. 15). A ausência de anticorpos específicos, IgG anti-L7/L12, demonstrou que os camundongos não apresentaram nenhum tipo de resposta imune sistêmica ao antígeno. Esses resultados diferem dos estudos realizados, utilizando linhagens de *L. lactis*, produtoras do TTFC, um imunógeno potente, que quando administradas pela via intragástrica demonstraram capacidade de estimular uma resposta humoral sistêmica nos camundongos imunizados (Robinson *et al.*, 1997; Grangette *et al.*, 2002). Em 2001, Lee e colaboradores utilizaram linhagens recombinantes de *L. lactis*, produtoras da subunidade B da urease de *Helicobacter pylori* (UreB), um imunógeno menos potente que o TTFC, como vacinas vivas orais e testaram cinco regimes de vacinação diferentes, sendo que, apenas em um destes, os camundongos foram capazes de induzir anticorpos sistêmicos antígeno-específicos. No entanto, esse regime era inviável para ser aplicado no desenvolvimento deste trabalho, uma vez que o período de vacinação é de dois meses, um tempo muito longo para que fosse possível repetir várias vezes os experimentos. Entre esses regimes de vacinações, um era similar ao que foi adotado nesse trabalho de dissertação, e como foi observado, em ambos, as linhagens recombinantes de *L. lactis* não foram capazes de induzir a produção de IgG antígeno-específica. Essa diferença na resposta observada nos dois estudos, sugere que a

capacidade do *L. lactis*, como sistema de expressão e apresentação de antígenos heterólogos, em estimular uma resposta imune a nível sistêmico, está associada ao potencial imunogênico do antígeno expresso. Uma hipótese possível para explicar esse fato é a de que o protocolo adotado nas imunizações com linhagens de *L. lactis* produtoras de TTFC, pode não ser apropriado para alguns tipos de antígenos com potencial imunogênico mais fraco, assim como UreB e L7/L12.

Sabe-se que a resposta imune é compartimentalizada, ou seja, a existência de uma resposta imune de mucosa não implica, necessariamente, na indução de uma resposta imune sistêmica. O antígeno administrado pela via oral, ao atingir as PP, pode ativar linfócitos B e T, no entanto, nem sempre, estes linfócitos estimulados caem na corrente sanguínea e linfática (McGhee *et al.*, 1992; Dougan, 1994). Portanto, esse fato, também pode explicar a ausência de uma resposta imune sistêmica dos camundongos vacinados contra o antígeno L7/L12.

No caso da linhagem que secreta a proteína L7/L12 (pSEC:LEISS:L7/L12) e da que produz L7/L12 ancorada à parede celular (pANC:L7/L12), acredita-se que a ausência de uma resposta imune humoral sistêmica possa estar associada à forma de apresentação do antígeno, ou seja, por estar esse exposto ao meio, acaba sendo degradado por proteinases nele presentes antes que seja apresentado ao sistema imune. O fato de *L. lactis* não ser uma bactéria capaz de invadir as células, pode, também, dificultar a indução desse tipo de resposta imune. Esses experimentos foram realizados em duplicata, e os resultados confirmados. A linhagem produtora de L7/L12 no citoplasma (pCYT:L7/L12) foi selecionada para utilização nos ensaios de imunização que se seguiram, baseados nos relatos de Corthier e colaboradores (1997, 1998) que mostraram que os antígenos produzidos nas formas secretada e ancorada a parede

celular, nas BAL, quando administrados pela via intragástrica, tornam-se menos imunogênicos, uma vez que estão sujeitos a degradação causada pelo meio ácido do trato gastrointestinal.

1.4. Ensaio de imunização utilizando a linhagem pCYT:L7/L12 associada a adjuvantes de mucosa

De modo a potencializar a resposta imune induzida pela linhagem recombinante de *L. lactis* produtora de L7/L12 na forma citoplasmática (pCYT:L7/L12), ensaios de imunização foram realizados, utilizando essa linhagem associada a quatro diferentes adjuvantes de mucosas. Foram utilizados como adjuvantes de mucosa: (i) o derivado atóxico da toxina termolábil (LT), denominada LT_(R192G), que é produzida por uma linhagem de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e considerado um forte imunógeno capaz de induzir respostas imunes sistêmicas (Ricci *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2000); (ii) a linhagem de *Lb. delbrueckii* (previamente identificada como *Lb. acidophilus* UFV_H2b20), capaz de estimular o sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro (Neumann *et al.*, 1998); (iii) a linhagem recombinante de *L. lactis* (LBH 153) que secreta as duas sub-unidades da IL-12 murina p35 e p40 (iv) e a linhagem recombinante de *L. lactis* (LBH 163) que secreta as sub-unidades p35 e p40 da IL-12 murina fusionadas na mesma fase de leitura. A citocina IL-12 vem sendo co-administrada com vacinas de segunda (proteína recombinante) e terceira gerações (vacinas de DNA) e foi demonstrado através da utilização dessa citocina pode-se induzir um aumento da resposta imune antígeno-específica (Boyaka *et al.*, 1999, Kovarik *et al.*, 2001, Hultgren *et al.*, 2001).

A determinação dos níveis de IgA anti-L7/L12, no conteúdo fecal dos camundongos vacinados apenas com a linhagem recombinante pCYT:L7/L12 ou associada aos diferentes adjuvantes de mucosa, através da administração pela via intragástrica, foi realizada pelo método de ELISA. Foram realizadas três coletas de fezes, nos dias 15, 24 e 38 para posterior dosagem das imunoglobulinas.

Foi observado que, os grupos imunizados apenas com a linhagem pCYT:L7/L12, com pCYT:L7/L12 + LBH 163 e pCYT:L7/L12 + *Lb. delbrueckii* produziram níveis significativos de IgA específica anti-L7/L12 quando comparados aos grupos controles. A partir desses resultados, foram selecionados, como adjuvantes de mucosa, as linhagens LBH 163, secretora de IL-12 e a linhagem de *Lb. delbrueckii*, para serem utilizadas associadas à linhagem pCYT:L7/L12, na realização de outros ensaios de imunização e de provas de proteção contra a brucelose experimental.

1.5. Novos ensaios de imunização

Foram realizados novos ensaios, utilizando a linhagem de *L. lactis*, produtora de L7/L12 no citoplasma (pCYT:L7/L12) sozinha ou associada às linhagens LBH 163 ou de *Lb. delbrueckii*. Nesses ensaios de imunização, além dos grupos vacinados com PBS e pVE3655, foram incluídos mais dois grupos controles: um vacinado com a linhagem LBH163 e o outro com o *Lb. delbrueckii*. Esses controles permitem analisar se a resposta imune de IgA anti-L7/L12, está sendo induzida pela associação desses adjuvantes de mucosa à linhagem pCYT:L7/L12 ou exclusivamente por eles.

Novamente não foi detectado reatividade de imunoglobulinas do isotipo IgG ao antígeno L7/L12 de *B. abortus* nos soros dos camundongos vacinados, com exceção do

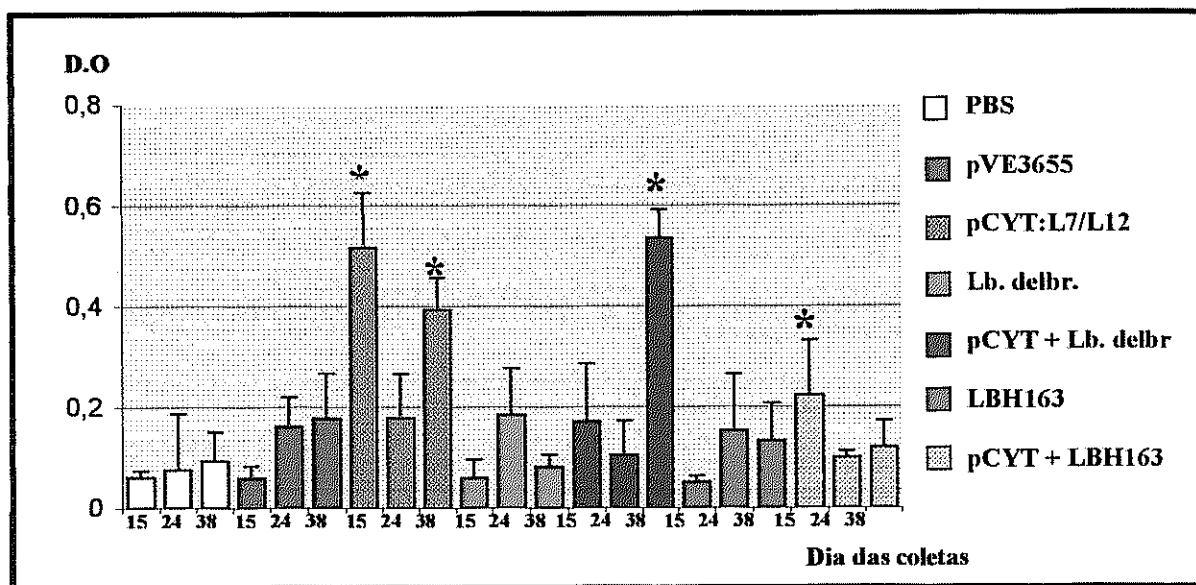


FIGURA 16: Análise da resposta humoral de mucosa após análise de IgA anti-L7/L12 nas fezes dos camundongos imunizados com a linhagem recombinante de *L. lactis* produtora da proteína L7/L12 da *B. abortus* no citoplasma, associada ou não a adjuvantes de mucosa. Os anticorpos nas fezes coletadas nos dias 15, 24 e 38 dos camundongos vacinados foram medidos através da técnica de ELISA e estão representados nos gráficos acima. Os valores apresentados representam a média do grupo de cinco camundongos. * indica a indução significativa de IgA anti-L7/L12 do grupo vacinado quando comparado com os seus respectivos controles negativos: animais que receberam apenas PBS, *L. lactis* pVE3655, *Lb. delbrueckii* e LBH163.

grupo imunizado com a S19 (controle positivo). Portanto o uso das linhagens LBH163 e de *Lb. delbrueckii* como adjuvantes associadas à linhagem pCYT:L7/L12, não foi capaz de promover a indução de IgG anti-L7/L12.

Entretanto, os grupos imunizados com as linhagens pCYT:L7/L12, pCYT:L7/L12 + *Lb. delbrueckii* e pCYT:L7/L12 + LBH 163 induziram níveis significativos de IgA anti-L7/L12 quando comparados com os seus respectivos controles (FIG. 16). O grupo vacinado apenas com a linhagem pCYT:L7/L12 foi capaz de produzir níveis consideráveis de IgA anti-L7/L12 após o primeiro e terceiro período de imunização, resultado semelhante àquele obtido por Robinson et al. (1997) com o TTFC. No entanto, pode-se observar que as linhagens utilizadas como adjuvantes LBH163 e *Lb. delbrueckii*, quando associadas à linhagem pCYT:L7/L12, não foram capazes de potencializar a resposta imune de mucosa. Em seguida, foram realizadas as provas de proteção contra a brucelose experimental.

1.5.1. Proteção contra a brucelose experimental

Em 1971, Verger demonstrou que camundongos eram resistentes ao desafio com a *B. abortus*, administrada pela via intragástrica. Assim, foi decidido que os animais seriam desafiados pela via intraperitoneal.

Duas semanas após o último período de vacinação, os camundongos imunizados, de todos os grupos, foram desafiados com a linhagem selvagem da *B. abortus* 2308 pela via intraperitoneal. Os níveis de proteção foram determinados através da contagem de UFC dessa bactéria, encontradas no baço dos animais. A Tabela 8

TABELA 8: Nível de proteção induzida pela imunização com a linhagem recombinante de *L. lactis* pCYT:L7/L12 sozinha ou associada com LBH163 ou *Lb. delbrueckii*

GRUPOS	UNID. DE B. abortus S2308 NO BAÇO DOS CAMUNDONGOS IMUNIZADOS MÉDIA ± DESVPAD	UNID. DE PROTEÇÃO EM LOG ₁₀
pVE:3655	6.96 ± 0.200	
pCYT:L7/L12	6.43 ± 0.289	0.53*
<i>Lb. delbrueckii</i>	6.92 ± 0.155	
pCYT:L7/L12 + <i>Lb.</i> <i>delbrueckii</i>	6.45 ± 0.200	0.47*
LBH163	6.96 ± 0.22	
pCYT:L7/L12 + LBH163	6.46 ± 0.182	0.50*
PBS	7 ± 0.243	
S19	5.70 ± 0.251	1.30*

* p < 0,05

mostra os resultados de proteção obtidos, comparando os grupos vacinados com os seus respectivos controles negativos. A imunização com a linhagem pCYT:L7/L2, sozinha ou associada aos adjuvantes de mucosa, conferiu uma proteção parcial contra o desafio, quando comparada com os grupos controles. Como esperado, o grupo imunizado com a linhagem vacinal S19 da *B. abortus* (controle positivo) quando comparado com o grupo controle PBS mostrou um nível significativo de imunidade protetora maior do que os demais grupos vacinados. Esses resultados confirmaram que as linhagens LBH163 e *Lb. delbrueckii*, utilizadas como adjuvantes de mucosa, não foram capazes de potencializar as respostas imunes da linhagem pCYT:L7/L12, nem tampouco de alterar a imunidade protetora induzida por essa linhagem. Esses dados são representativos de dois experimentos de imunização que foram realizados dentro dos mesmos padrões.

O processo de infecção pode ser influenciado por respostas imunes humoral e celular, mas essa última é essencial para eliminação da *Brucella*. A *B. abortus* tem as mucosas como porta de entrada no hospedeiro e a indução de uma resposta imune local poderia bloquear a entrada deste patógeno. Embora os camundongos sejam resistentes a infecção da *B. abortus* pela via oral, trabalhamos com esse modelo animal, pela inexistência de outros modelos de pequeno porte. A utilização de linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras do antígeno ribossomal L7/L12 da *B. abortus* como vacinas vivas orais, demonstrou que essas linhagens não foram capazes de induzir uma resposta imune sistêmica. Além disso, o desafio, realizado via intraperitoneal, não permitiu afirmar que a produção de IgA anti-L7/L12 estava associada à proteção parcial atingida pelos grupos pCYT:L7/L12, pCYT:L7/L12 + *Lb. delbrueckii* e pCYT:L7/L12 + LBH 163 contra a brucelose experimental. Dessa forma, acredita-se que essa proteção parcial atingida pelo grupo pCYT:L7/L12, sozinho e associado aos adjuvantes de

mucosa, pode estar relacionada a uma resposta imune celular. Outros experimentos deverão ser realizados para analisar a implicação da resposta imune celular, como a dosagem de INF- γ , citocina que está relacionada com a resposta imune protetora contra a brucelose (Oliveira *et al.*, 2002).

2. Construção de linhagens de *L. lactis* expressando a proteína GroEL da *B. abortus*

2.1. Amplificação e mutagênese dirigida do gene *GroEL* por PCR

Para a construção das linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras da proteína de choque térmico GroEL da *B. abortus*, a sequência codificadora do gene *GroEL* foi amplificada por PCR, a partir do plasmídeo pMAL:GroEL, com iniciadores desenhados especificamente para cloná-la direcionalmente em vetores de expressão de *L. lactis* e também prepará-la para que esses vetores pudessem produzir o antígeno GroEL em duas localizações celulares diferentes: citoplasma e meio extracelular. A inserção de sítios de restrição artificiais para as enzimas *NsiI* e *HpaI*, nas extremidades do fragmento contendo a sequência codificadora do gene *GroEL* permitiram clonar direcionalmente os fragmentos amplificados por PCR nesses vetores. Para expressar a proteína, no citoplasma da célula, foi necessário retirar o primeiro códon do gene *GroEL* uma vez que, o sítio de restrição para a enzima *NsiI* possui um ATG que seria reconhecido como códon de iniciação. Além disso, a presença de duas metioninas poderia gerar problemas na expressão gênica. Para secretar a proteína para o meio extracelular, duas bases (C e A) foram inseridas em seguida ao sítio de restrição

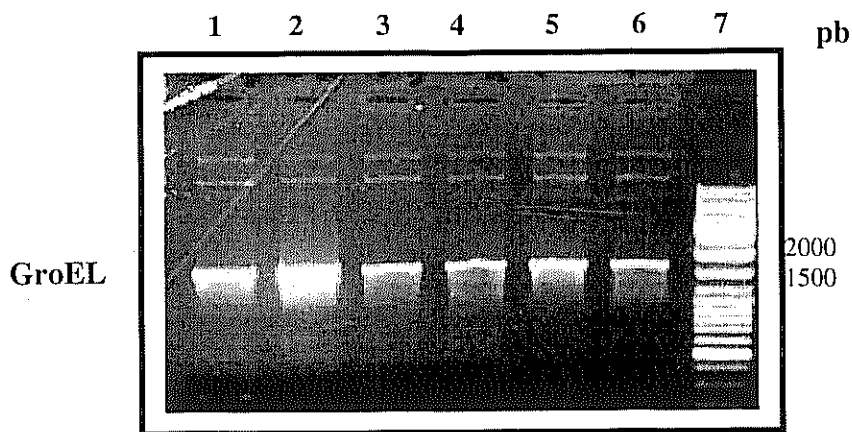


FIGURA 17: Análise do produto da amplificação por PCR do gene *GroEL* da *B. abortus*. Eletroforese em gel de agarose à 0,8% corado com brometo de etídio mostrando o produto amplificado do gene *GroEL* da *B. abortus*. A canaleta 7 mostra o padrão de peso molecular Gene Ruller™ DNA Ladder Mix (GIBCO). O gene *GroEL* foi amplificado para ser clonado em vetores de expressão de *L. lactis* para a produção da proteína no citoplasma (canaletas de 1 a 3) e secretada (canaletas de 4 a 6).

artificial para a enzima *NsiI*, para que o códon de iniciação do peptídeo sinal, presente no vetor de expressão, fosse reconhecido, adaptando a sua fase de leitura à fase de leitura do *GroEL*. Assim fragmentos de 1650 pb, correspondentes à parte codificadora do gene *GroEL* da *B. abortus*, modificados em suas extremidades, foram amplificados para serem clonados nos vetores de expressão de *L. lactis* (FIG. 17).

2.2. Clonagem e verificação da presença dos fragmentos amplificados no vetor pCRR II-TOPO

Os dois fragmentos amplificados para obtenção da expressão protéica nas formas citoplasmática e secretada, acima descritos, foram clonados no vetor pCRR II-TOPO (Invitrogen). Para confirmar as clonagens, seis colônias brancas de cada construção foram selecionadas e amplificadas por PCR. Em seguida, o DNA plasmidiano foi extraído e digerido, o que permitiu confirmar a presença dos insertos com o tamanho esperado e de purificá-los para serem sub-clonados nos vetores de expressão de *L. lactis*. Essas clonagens deram origem às duas construções intermediárias, pTOPO:CYT:*GroEL* e pTOPO:SEC:*GroEL* e foram realizadas para obtenção de grandes quantidades do fragmento purificado e para confirmação da digestão dos sítios artificiais de restrição contidos nas extremidades do mesmo. Essa técnica utilizada para clonar os fragmentos amplificados é rápida e eliminou essa variável na etapa de clonagem, ou seja, certificou-se que as extremidades foram realmente digeridas.

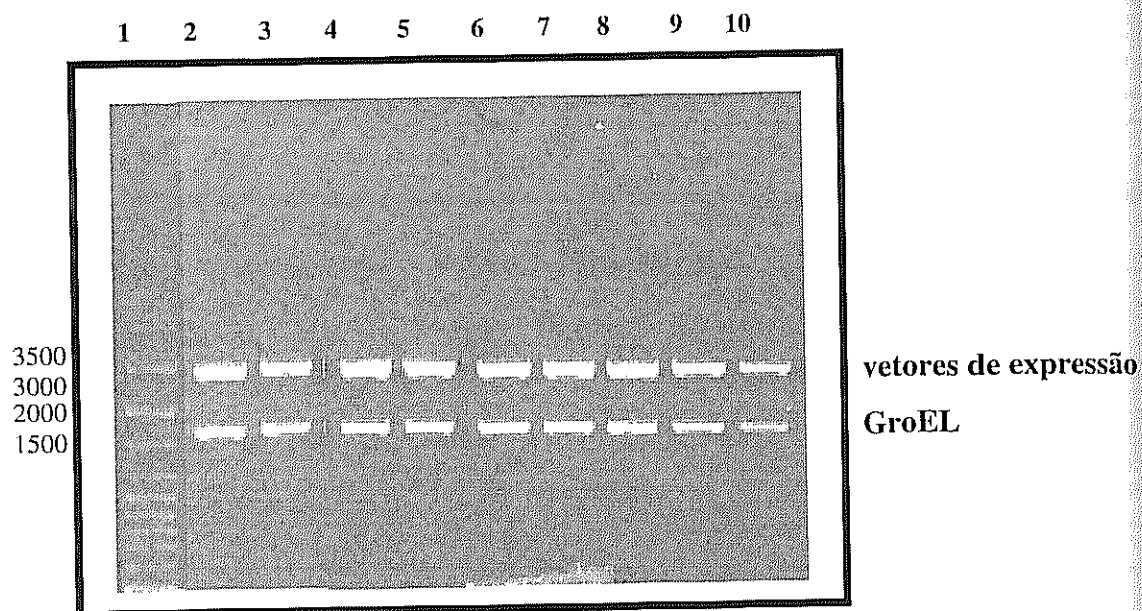


FIGURA 18. Análise dos perfis de digestão dos clones obtidos após a transformação em *L. lactis*. Gel de agarose à 0,8% exibindo os perfis eletroforéticos dos produtos de digestão de 9 clones obtidos após a transformação em *L. lactis*. A canaleta 1 mostra o padrão de peso molecular Gene Ruller™ DNA Ladder Mix (GIBCO). Canaletas de 2 a 4: clones da forma citoplasmática (pVE3702:GroEL); canaletas de 5 a 7: clones da forma secretada (pVE3684:GroEL) e nas canaletas de 8 a 10: clones da forma secretada contendo o propeptídeo sintético LEISS (pVE3719:GroEL).

2.3. Sub-clonagem do gene *GroEL* da *B. abortus* nos vetores de expressão para a produção da proteína nas formas citoplasmática (pVE3702) e secretada (pVE3684 e pVE3719)

Os vetores de expressão pVE3702 (forma citoplasmática), pVE3684 e pVE3719 (formas secretadas) foram previamente digeridos para liberação do gene *nuc* (anexo A). Os fragmentos purificados, contendo a sequência codificadora do gene *GroEL*, foram ligados aos respectivos vetores, nos sítios de restrição *NsiI* e *EcoRV*, e, ao vetor pVE3719, nos sítios de restrição *NsiI* e *ClaI*. Os produtos de ligação foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* TG1. Confirmada as clonagens, através da verificação da presença dos insertos nos vetores de expressão de *L. lactis*, um clone positivo de cada foi selecionado. Primeiramente, a clonagem foi realizada em *E. coli*, devido à sua alta eficiência de transformação (10^8 a 10^{10}), já que essa, na linhagem de *L. lactis*, é inferior (10^4 a 10^6). Em seguida, foi extraído o DNA plasmidiano desses clones e, então, transformado por eletroporação em *L. lactis* NZ9000. Apesar dessa bactéria ser utilizada em laboratório, a linhagem é selvagem e fenômenos como o de restrição e o de modificação diminuem a probabilidade de eficiência das clonagens, quando misturas de ligação são utilizadas na transformação. Dessa forma, construções já obtidas, quando transferidas para *L. lactis* aumentam as chances de obtenção de clones desejados.

Após a transformação em *L. lactis*, clones foram selecionados aleatoriamente e digeridos para verificar a presença do fragmento, contendo a sequência do gene *GroEL* (FIG. 18). Em seguida, esses clones foram, estocados, congelados e denominados como pCYT:GroEL (produção da proteína no citoplasma), pSEC:GroEL e pSEC:LEISS:GroEL (secreção da proteína produzida) (FIG. 19). A confirmação da

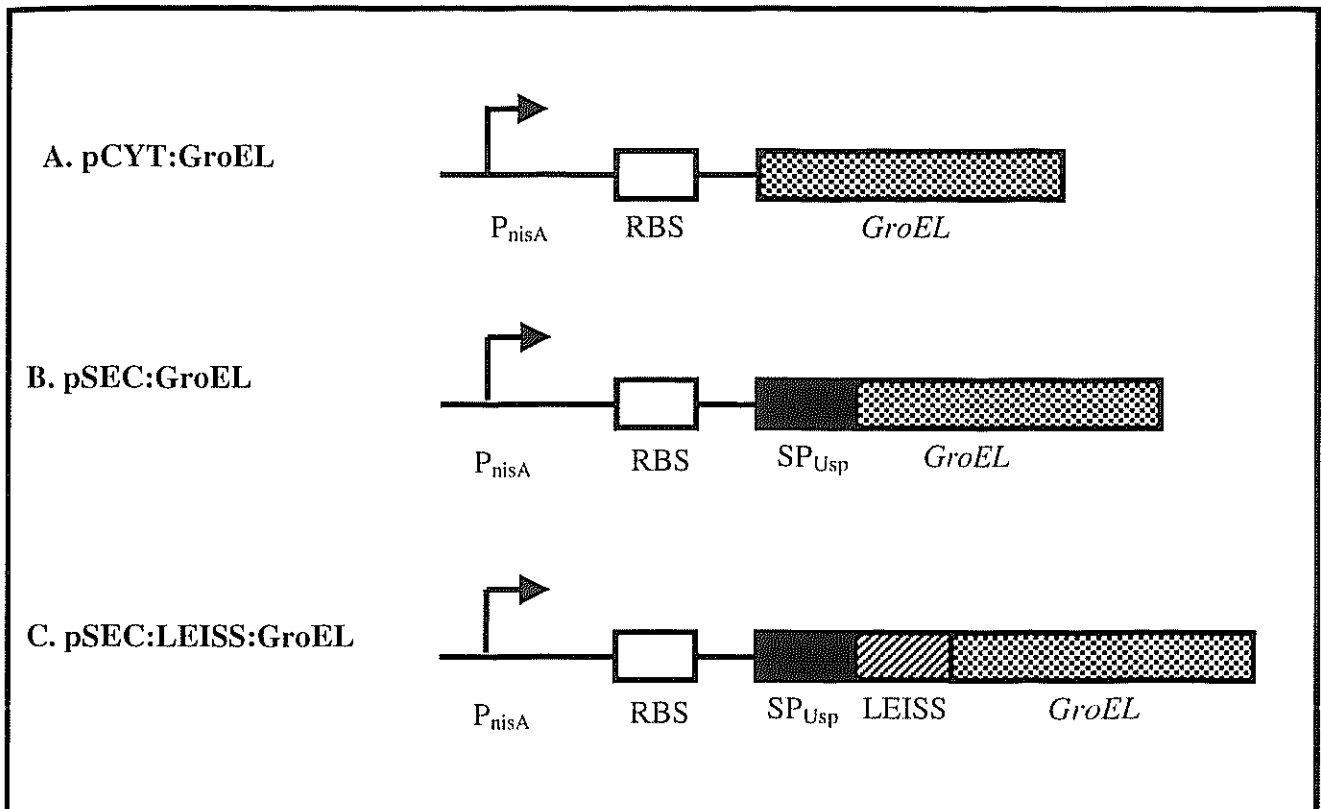


FIGURA 19: Esquema das unidades transcricionais para produção da proteína GroEL da *B. abortus* nas linhagens recombinantes de *L. lactis*. Representado pela seta: promotor induzido por nisina (P_{nisA}); \square representa o RBS, sítio de ligação do ribossomo do gene *usp45*; \blacksquare representa o peptídeo sinal de Usp45 (PS_{Usp45}); ▨ representa LEISSTCDA (LEISS), sequência codificadora do propeptídeo sintético; ▩ representa a sequência codificadora do gene *GroEL*.

GroEL - 60 kDa

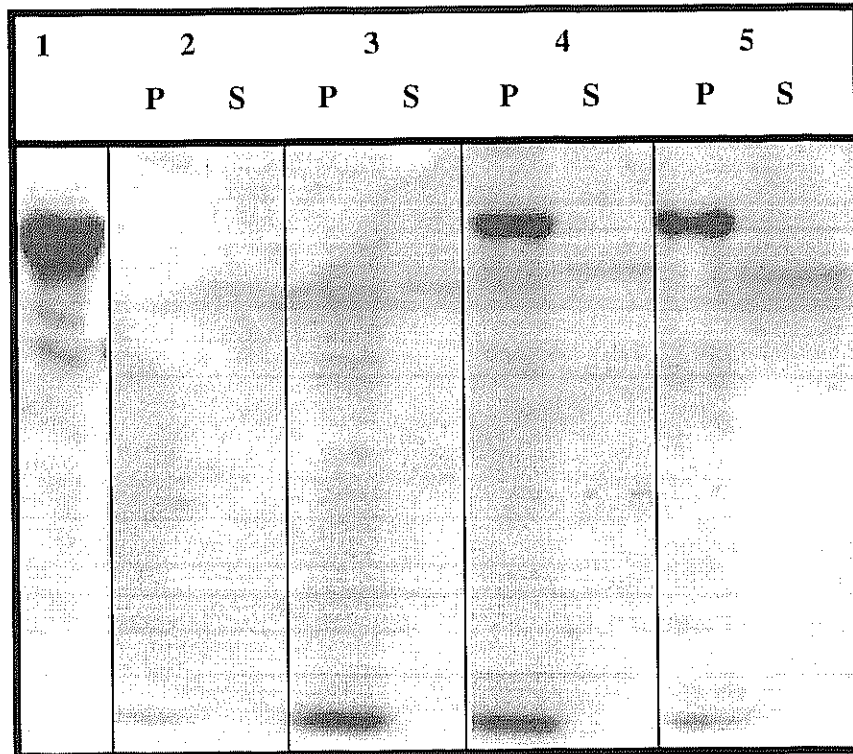


FIGURA 20: Análise da produção da proteína GroEL da *B. abortus* em linhagens recombinantes de *L. lactis* através do “western blot”. Na primeira coluna está a proteína GroEL purificada (controle positivo). Caneleta 2: linhagem recombinante de *L. lactis* pVE3655 (controle negativo), Caneleta 3: pCYT:GroEL (forma citoplasmática), Caneleta 4: pSEC:GroEL (forma secretada), Caneleta 5: pSEC:LEISS:GroEL (forma secretada da proteína fusionada ao propeptídeo sintético LEISS). Todas as linhagens foram induzidas com nisina durante 1 hora. (P) lisados celulares e (S) frações do sobrenadante. Imunodeteção realizada por anticorpos anti-GroEL.

integridade da sequência nucleotídica do gene *GroEL* nesses vetores foi realizada através de seqüenciamento.

2.4. Análise da expressão do gene *GroEL* da *B. abortus* nas linhagens recombinantes de *L. lactis* pela técnica de “western blot”

Com o objetivo de verificar a expressão do gene *GroEL* da *B. abortus* nas três linhagens construídas em *L. lactis*, descritas anteriormente, foram realizados “western blots”. As proteínas do extrato celular e as proteínas presentes no sobrenadante foram fracionadas a partir de células cultivadas das linhagens construídas, induzidas e não induzidas pela nisina e o controle negativo (pVE3655).

Nas culturas induzidas pela nisina, não foi detectado nenhum sinal nas linhagens pVE3655 (controle negativo) e pCYT:GroEL (forma citoplasmática). Entretanto, nas linhagens pSEC:GroEL e pSEC:LEISS:GroEL (formas secretadas) pode-se observar a produção da proteína GroEL no extrato celular, mas não no sobrenadante. Nem mesmo o propeptídeo sintético LEISS foi capaz de melhorar a eficiência de secreção da proteína GroEL (FIG. 20). Esse fato já havia sido demonstrado anteriormente com uma outra proteína, NSP4 do rotavírus bovino que, quando produzida em *L. lactis*, não tem detectada a sua secreção, mesmo quando fusionada ao LEISS (Enouf *et al.*, 2001; Miyoshi *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos demonstram que a linhagem recombinante de *L. lactis* produtora de GroEL da *B. abortus*, no citoplasma (pCYT:GroEL), não produz essa proteína em quantidades detectáveis pela técnica de “western blot”. Não temos explicação plausível para a não produção da proteína, uma vez que, a sequência gênica

GroEL está na fase de leitura correta, resultado obtido pelo sequenciamento efetuado com a construção que deu origem a essa linhagem.

As linhagens recombinantes produtoras de GroEL da *B. abortus* na forma secretada (pSEC:GroEL e pSEC:LEISS:GroEL), quando induzidas pela nisina, foram capazes de produzir a forma precursora da proteína GroEL no citoplasma, mas não de secretá-la. Uma possível explicação para o fato, pode ser atribuída às propriedades alostéricas da proteína GroEL, que constantemente muda sua conformação (Xu & Sigler, 1998). Assim, a proteína quando produzida pode ligar-se a polipeptídeos, alterar sua conformação e não mais ter capacidade de ser exportada pela maquinaria de secreção do *L. lactis*. Esse fato já foi anteriormente observado em um sistema eucarioto em que dois vetores de expressão, com sinais para a exportação da proteína, apresentaram uma fraca secreção da proteína GroEL da *B. abortus* (Leclercq *et al*, 2001). Outro ponto que podemos considerar, para explicar a não secreção dessa proteína para o meio extracelular, no nosso sistema, é a provável associação de GroEL à superfície celular, como já observado em *Legionella pneumophila* (Garduno *et al*, 1998), *M. leprae* (Gillis *et al*, 1985) e *H. pylori* (Vanet & Labigne, 1998).

A linhagem de *L. lactis*, produtora da proteína ribossomal L7/L12 da *B. abortus* no citoplasma, quando utilizada como vacina viva e administrada pela via intragástrica, foi capaz de induzir uma imunidade protetora parcial contra a brucelose experimental em camundongos. No entanto, a linhagem construída com a proteína GroEL, para produção citoplasmática, não produz essa proteína, pelo menos em quantidades que sejam detectadas pela técnica de "western blot". Portanto, mesmo no caso de uma produção basal, essa linhagem não corresponderia às nossas expectativas de utilizá-la como vacina viva. No entanto, as linhagens construídas produtoras de GroEL na forma

secretada, embora não sejam capazes de secretar a proteína, são capazes de produzi-la no citoplasma da célula, em quantidades consideráveis, na sua forma precursora, mas esse fato não inviabiliza, testá-las em ensaios de imunização oral contra a brucelose experimental. Entretanto, devemos considerar que essa proteína pode não estar biologicamente ativa nessa forma, assim como suspeitamos da utilização das linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras da proteína L7/L12 nas formas secretada e ancorada, em que as formas precursoras não induziram uma resposta imune do isotipo IgA. O acúmulo da proteína precursora de GroEL no citoplasma, pode ser um indicativo de que essa não estava na sua conformação nativa e conseqüentemente sem atividade biológica.

O sistema de expressão NICE, utilizado para a construção das linhagens recombinantes de *L. lactis*, produtoras da proteína L7/L12 e GroEL da *B. abortus*, é, atualmente, o melhor sistema para a expressão de proteínas heterólogas em *L. lactis*. Esse sistema pode ser utilizado na produção de outros antígenos da *B. abortus*, com maior potencial imunogênico, nas linhagens de *L. lactis* e para que essas possam ser testadas como vacinas orais contra a brucelose experimental. Além disso, outras vias de mucosa podem ser testadas, como a nasal e a vaginal, e pode-se também administrar diferentes linhagens produtoras de diferentes proteínas imunogênicas da *B. abortus*, como um coquetel de antígenos, para o aperfeiçoamento desse sistema de vacinação.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, é possível concluir que:

- A linhagem de *L. lactis*, produtora da proteína L7/L12 no citoplasma (pCYT:L7/L12), utilizada como vacina viva, quando administrada pela via intragástrica em camundongos BALB/c, foi capaz de induzir níveis de IgA anti-L7/L12 e uma imunidade parcial protetora contra a brucelose experimental. Essa imunidade, provavelmente, está sendo induzida por uma resposta imune celular.
- A utilização dos adjuvantes de mucosa: as linhagens *Lb. delbrueckii*, LBH163, LBH153 e o LT não foram capazes de potencializar a resposta imune de mucosa gerada pela linhagem pCYT:L7/L12. No entanto, as linhagens *Lb. delbrueckii* e LBH163, quando associadas a linhagem pCYT:L7/L12, embora tenham induzido níveis significativos de IgA anti-L7/L12 e uma imunidade parcial protetora contra a infecção da *B. abortus*, não atuam na sua potencialização.
- Foram construídas três linhagens recombinantes de *L. lactis*, produtoras da proteína de choque térmico GroEL da *B. abortus*, endereçadas ao citoplasma e meio extracelular. A proteína não foi detectada na forma citoplasmática, mas as formas secretadas, embora não sejam capazes de realizar o endereçamento de GroEL para o meio extracelular, apresentam níveis significativos da forma precursora da proteína no citoplasma.

➤ Apesar dos resultados obtidos com as linhagens recombinantes de L7/L12 não terem induzido uma proteção igual ou superior à vacina S19 da *B. abortus*, através desse estudo, não se pode inviabilizar a utilização desse sistema de vacinação contra a brucelose experimental, pois precisam-se testar novas formas de administração, coquetéis de antígenos da *B. abortus* e outras linhagens de BAL como vetores de apresentação de antígenos.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

O presente trabalho abre perspectivas para que se possa:

- Realizar novos ensaios de imunização, utilizando a linhagem pCYT:L7/L12 para se comprovar se a proteção obtida foi desencadeada por uma resposta imune celular.
- Realizar novos ensaios de imunização, testando outras vias de administração nas mucosas como a nasal e vaginal.
- Construir novas linhagens recombinantes produtoras de L7/L12, utilizando uma bactéria láctica comensal, como *Lactobacillus*, que tem maior permanência no trato gastrointestinal, para serem testadas como vacinas vivas contra a brucelose experimental.
- Testar as linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras da proteína GroEL (formas secretadas), que foram construídas durante esse trabalho, sozinha ou associada à linhagem pCYT:L7/L12, como vacinas vivas contra a brucelose experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, M. and Collins, M. D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 95-107.
- Al-Mariri, A., Tibor, A., Mertens, P., De Bolle, X., Michel, P., Godefroid, J., Walravens, K. and Letesson, J. (2001a). Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect. Immun.* 69: 4816-4822.
- Al-Mariri, A., Tibor, A., Mertens, P., De Bolle, X., Michel, P., Godefroid, J., Walravens, K. and Letesson, J. (2001b). Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect. Immun.* 69: 6264-6270.
- Al-Mariri, A., Tibor, A., Lestrade, P., Mertens, P., De Bolle, X. and Letesson, J. (2002). *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or P39 antigen. *Infect. Immun.* 70: 1915-1923.
- Araya, L., Elzer, P., Rowe, G., Enright, F. and Winter, A. (1989). Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *J. Immunol.* 143: 3330-3337.
- Arnau, J., Hjerl-Hansen, E. and Israelsen, H. (1997). Heterologous gene expression of bovine plasmin in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 331-338.

- Babiuk, L. A. (1999). Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine*. 17: 1587-1595.
- Bachrach, G., Banai, M., Bardenstein, S., Hoida, G. and Bercovier, H. (1994). *Brucella* ribosomal protein L7/L12 is a major component in the antigenicity of Brucellin INRA for delayed-type hypersensitivity in *Brucella*-sensitized guinea pigs. *Infect. Immun.* 62: 5361-5366.
- Baldwin, C., Jiang, X. and Fernandes, D. M. (1993). Macrophage control of *Brucella abortus*: influence of cytokines and iron. *Trends Microbiol.* 1: 99-104.
- Baloglu, S., Toth, T. E., Schuring, N. S. and Boyle, S. M. (2000). Humoral immune response of BALB/c mice to a vaccinia virus recombinant expressing *Brucella abortus* GroEL does not correlate with protection against *B. abortus* challenge. *Vet. Microbiol.* 76: 193-199.
- Bermudez-Humaran, L. G., Langella, P., Miyoshi, A., Gruss, A., Guerra, R. T., Montes de Oca-Luna, R. and Le Loir, Y. (2002). Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 917-922.
- Bernasconi, E., Germond, J. E., Delley, M., Fritsche, R. and Corthesy, B. (2002). *Lactobacillus bulgaricus* proteinase expressed in *Lactococcus lactis* is a powerful carrier for cell wall-associated and secreted bovine beta-lactoglobulin fusion proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 62917-23.

- 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.
- Bonato, V. L. D., Lima, V. M. F., Tascon, R. E., Lowrie, D. B. and Silva, C. L. (1998). Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect. Immun.* 66: 169-175.
- Boyaka, P. N., Marinaro, M., Jackson, R. J., Menon, S., Kiyono, H., Jirillo, E. and McGhee, J. R. (1999). IL-12 an effective adjuvant for induction of mucosal immunity. *J. Immunol.* 25: 122-128.
- Brassart, D. and Schiffrin, E. J. (1997). The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends Food Sci. Technol.* 8: 321-326.
- Bricker, B.J., Ewalt, D.R., MacMillan, A.P., Foster, G. and Brew, S. (2000) Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J. Clin. Microbiol.* 38(3): 1258 - 1262
- Bruce, D. (1887). Note on discovery of microorganism in Malta Fever. *Practitioner* 39: 161-163.
- Buchman, G. W., Banerjee, S. and Hansen, J. N. (1988). Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* 263: 16260-16266.
- Bureau, J. P., Caravano, R., Garelli, L. and Lemaire, J. (1989). Cellular responses to "brucelline INRA" during the experimental brucellosis of the mouse. *Immunobiology.* 179: 8-16.

- Chamberlain, L., Wells, J. M., Robinson, R., Schofield, K. and Le Page, R. W. F. (1997). Mucosal immunization with recombinant *Lactococcus lactis*. p. 83-106. In Pozzi, G. and Wells, J. M. (ed), Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization. Springer-Verlag and Landes Bioscience, Austin, Tex.
- Chandrapati, S. and O'Sullivan, D. (1999). Nisin independent induction of the *nisA* promoter in *Lactococcus lactis* during growth in lactose or galactose. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 191-198.
- 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. Immun.* 8: 545-551.
- Cheers, C. and Pagram, F. (1979). Macrophage activation during experimental murine brucellosis: a basis for chronic infection. *Infect. Immun.* 23: 197-205.
- Chen, T. H. and Elberg, S. S. (1970). Immunization against *Brucella* infections: immune response of mice, guinea pigs, and *Cynomolgus philipinensis* to live and killed *Brucella melitensis* strain Rev. I administered by various methods. *J. Infect. Dis.* 122: 489-500.
- Cheng, E., Cárdenas-Freytag, L. and Clements, J. D. (2000). The role of camp in mucosal adjuvanticity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT). *Vaccine.* 18: 38-49.
- Cheville, N.F., Stevens, M.G., Jensen, A.E., Tatum, F.M. and Halling, S.M. (1993). Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strain of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 54: 175-180.

- Collingwood, K., Wilson, P. W., Waterfield, N. R., Le Page, R. W. F and Wells, J. M. (1995). Gram positive broad host range expression vectors. Development in *Lactococcus lactis*. International Dairy Lactic Acid Bacteria Conference Abstract, New Zealand.
- Corbel, M. J. (1997). Brucellosis : an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 213-221.
- Corthier, G., Delorme, C., Ehrlich, S. D. and Renault, P. (1997). Assessment of bacterial physiology in the digestive tract by use of luciferase gene as promoter probe. *Adv. Exp. Med. Biol.* 418: 831-832.
- Corthier, G., Delorme, C., Ehrlich, S. D. and Renault, P. (1998). Use of luciferase genes as biosensors to study bacterial physiology in the digestive tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2721-2722.
- Cotton, W. E., Buck, J. M. and Smith, H. E. (1933). Efficacy and safety of abortation vaccines prepared from *Brucella abortus* strains of different degrees of virulence. *Agr. Res.* 46: 291-314.
- Cripps, A. W., Kyd, J. M. and Foxwell, R. (2001). Vaccines and mucosal immunisation. *Vaccine.* 19: 2513- 2515.
- Daly, C., Fitzgerald, G. F. and Davis, R. (1996). Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70: 90-110.
- Daly, J. G., Griffiths, S. G., Kew, A. K., Moore, A. R. and Olivier, G. (2001). Characterization of attenuated *Renibacterium salmoninarum* strains and their use as live vaccines. *Dis. Aquat. Organ.* 44: 121-126.

- de Reviere, M. and Fensterbank, R. (1984). Biological control of the brucellin INRA in sensitised guinea pigs: a guide for the statistical analysis of results. *Ann. Rech. Vet.* 15: 395-403.
- 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. and 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. and 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. p. 52-105.
- de Vos, W. M., Kuipers, O. P., van der Meer, J. R. and Siezen, R. J. (1995). Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 17: 427-437.
- de Vos, W. M. (1999). Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 289-295.
- Dickinson, B. L. and Clements, J. D. (1995). Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect. Immun.* 63: 1617-1623.
- Dickinson, B. L. and Clements, J. D. (1996). Use of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as an oral adjuvant. In Kiono, H., Ogra, P. L. and McGhee, J. R. (Eds.) *Mucosal Vaccines*, pp 73 - 87. Academic Press, San Diego.

- Dietrich, G., Kolb-Maurer, A., Spreng, S., Schartl, M., Goebel, W. and Gentschev, I. (2001). Gram-positive and Gram-negative bacteria as carrier systems for DNA vaccines. *Vaccine*. 19: 2506-2512.
- 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.
- Dougan, G. (1994). The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens : implications for oral vaccine development. *Microbiology*. 140: 215 - 224.
- Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, D. and Renault, P. (1999). Survival, Physiology, and Lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4881-4886.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3166-3168.
- Duwat, P., Cesselin, B., Sourice, S. and Gruss, A. (2000). *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 83-86.
- Edmonds, M., Booth, N., Hagijs, S., Walker, J., Enright, F., Roop II, R. M. and Elzer, P. (2000). Attenuation and immunogenicity of *Brucella abortus htrA cycL* double mutant in cattle. *Vet. Microbiol.* 76: 81-90.
- Elberg, S. S. (1986). A guide to the diagnosis, treatment and prevention of human brucellosis, WHO document VPH/81.31. World Health Organization Geneva.

- Ellis, R. W. (2001). Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines. *Vaccine*. 19: 2681-2687.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Hammelmann, M. and Entian, K. D. (1992). Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the NisB protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3730-3743.
- Enouf, V., Langella, P., Commissaire, J., Cohen, J. and Corthier, G. (2001). Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigen and immunogenic. *Appl. Environ. Microbiol.* p: 1423-1428.
- Ferreira, C. L. L. F. and Teshima, E. (2000). Prebióticos. *Biotechnologia*. 16: 22-25.
- Fischetti, V. A., Medaglini, D., Oggioni, M. and Pozzi, G. (1993). Expression of foreign proteins on Gram-positive commensal bacteria for mucosal vaccine delivery. *Cur. Opin. Biotech.* 4: 603-610.
- Foss, D.L. and Murtaugh, M. P. (2000). Mechanisms of vaccine adjuvanticity at mucosal surfaces. *Anim. Health Res. Rev.* 1: 3-24.
- Freney, J., Renaud, F., Hansen, W. and Bollet, C. *Precis de Bactériologie Clinique*. Paris: ESKA, 2000. p.1413-1423.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Gaeng, S., Scherer, S., Neve, H. and Loessner, M. J. (2000). Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2951-2958.
- Garduno, R. A., Faulkner, G., Trevors, M. A., Vaats, N. and Hoffman, P. (1998). Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 180: 505-513.

- Gasson, M. J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic acid streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154: 1-9.
- Geoffroy, M. C., Guyard, C., Quatannens, B., Pavan, S., Lange, M. and Mercenier, A. (2000). Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 383-391.
- Gill, H. S., Rutherford, K. J., Prasad, J. and Gopal P. K. (2000). Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Brit. J. Nutr.* 83: 167-176.
- Gillis, T. P., Miller, R.A., Young, D. B., Khanolkar, S. R. and Buchanan, T. M. (1985). Immunochemical characterization of a protein associated with *Mycobacterium leprae* cell wall. *Infect. Immun.* 49: 371-377.
- Gor, D. and Mayfield, J. E. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the *Brucella abortus groE* operon. *Biochim. Biophys. Acta.* 113: 120 - 122.
- Grangette, C., Muller, H., Goudercourt, D., Geoffroy, M., Turner, M. and Mercenier, A. (2001). Mucosal immune response and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect. Immun.* 69: 1547-1553.
- Grangette, C., Muller, H., Goudercourt, D., Geoffroy, Goudercourt, D., M., Turner, M. and Mercenier, A. (2002). Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and in vivo persistence. *Vaccine.* 20: 3304-3309.
- Gudvok, A.T. (1997). The L7/L12 ribosomal domain of the ribosome: structural and functional studies. *FEBS Lett.* 407: 253-256

- Hansen, W. and Ramuz, M. (2000). *Brucella. Précis de bactériologie clinique. Chap. 82: 1413-1421.*
- Hodgson, A. L., Carter, K., Tachedjian, M., Krywult, J., Corner, L. A., McColl, M. and Cameron, A. (1999). Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine. 17: 802-808.*
- Holzappel, W. H. and Schillinger, U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int. 35: 109-116.*
- Hultgren, O. H., Stenson, M. and Tarkowaski, A. (2001) Role of IL-12 in *Staphylococcus aureus*- triggered arthritis and sepsis. *Arthritis Res. 3: 41-47.*
- Isolauri, E., Joensuu, J., Suomalainen, H., Luomala, M. and Vesikari, T. (1995). Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine 13: 310-312.*
- 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 *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutants* surface protein antigen gene. *Infect. Immun. 58: 2929-2934.*
- Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev. 59: 171-200.*

- Kaletta, C. and Entian, K. D. (1989). Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* 171: 1597-1601.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49:209-224.
- Kitaura, H., Kinomoto, M. and Yamada, T. (1999). Ribosomal protein L7 included in tuberculin purified protein derivate (PPD) is a major heat-resistant protein inducing strong delayed-type hypersensitivity. *Scand. J. Immunol.* 50: 580-587.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, °, Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. and Siezen, R. (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82: 29-58.
- Kohler, S., Teysser, J., Cloeckert, A., Rouot, B. and Liautard, J. P. (1996). Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of *Brucella suis* within U937-derived phagocytes. *Mol. Microbiol.* 20: 701-712.
- Koprowski II, H., Levine, M. M., Anderson, R. J., Losonsky, G., Pizza, M. and Barry, E. (2000). Attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain CVD 1204 expressing colonization factor antigen I and mutant heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 68: 4884-4892.

- Kovarik, G., Martinez, X., Pihlgren, M., Bozotti, P., Tao, M., Kipps, T. J., Wild, T. F., Lambert, P. and Siegrist, C. (2001). Limitations of *in vivo* IL-12 supplementation strategies to induce Th1 early life responses to model viral or bacterial vaccine antigens. *Virology*. 268: 122-131.
- Kuipers, O. P., Beerthuysen, M. M., Siezen, R. J.b and de Vos, W. M. (1993). Characterization of the nisin genecluster 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., Pascalle G. G., de Ruyter, P. G. G. A., Kleerebezem, M. and de Vos, W. M. (1997). Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Tibtech*. 15: 135-140.
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G. G. A., Kleerebezem, M. and de Vos, W. M. (1998). Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnol.* 64: 15-21.
- Kuipers, O. P., Buist, G. and Kok, J. (2000). Current strategies for improving food bacteria. *Res. Microbiol.* 151: 815-822.
- Kurar, E. and Splitter, G. A. (1997). Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune responses. *Vaccine*. 15: 1851-1857.
- 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 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, M. H., Roussel, Y., Wilks, M. and 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*. *Vaccine.* 19: 3927-3935
- Leclerq, S., Harms, J. S., Rosinha, G. M. S., Azevedo, V. and Oliveira, S. C. (2001). Induction of a Th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene. *J. Med. Microbiol.* 50: 1-7.
- Lin, J., Adams, L. G. and Ficht, T. A. (1992). Characterization of the Heat Shock Response in *Brucella abortus* and isolation of the gene encoding the GroEL Heat Shock Protein. *Infect. Immun.* 60: 242 -2431.
- Lin, J., Adams, L. G. and Ficht, T. A. (1996). Immunological response to the *Brucella abortus* GroEL homolog. *Infect. Immun.* 64: 4396-4400.

- Maassen, C. B., Laman, J. D., den Bak-Glashouwer, M. J., Tielen, F. J., van Holten-Neelen, J. C., Hoogteijling, L., Antonissen, C., Leer, R. J., Pouwels, P. H., Boersma, W. J. and Shaw, D. M. (1999). Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine*. 17: 2117-2128.
- Macpherson, A. J., Hunziker, L., McCoy, K. and Lamarre, A. (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non pathogenic microorganisms. *Microbes Infect. Rev.* 3: 1021-1035.
- Marteau, P. and Rambaud, J. C. (1993). Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 207-220.
- Martins, P. C. and Gomes, A. T. (2000). Mudança Institucional: O grande desafio. In: M. C. Drumond e Castro & J. A. Bastos Portugal (Ed.). *Perspectivas e Avanços em Laticínios*. EPAMIG, Instituto Cândido Tostes, Juiz de Fora, MG. p. 76-103.
- McGhee, J. R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M. T., Eldridge, J. H., Hirasawa, M. and Kiyono, H. (1992). The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*. 10: 75-88.
- Medaglini, D., Ricci, S., Maggi, T., Rush, C. M., Manganelli, R., Oggioni, M. R. and Pozzi, G. (1997). Recombinant Gram-positive bacteria as vehicles of vaccine antigens. *Biotech. Ann. Rev.* 3: 297-312.

- Medaglini, D., Ciabattini, A., Spinosa, M. R., Maggi, T., Marcotte, H., Oggioni, M. R. and Pozzi, G. (2001). Immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing tetanus toxin fragment C confers protection from lethal challenge in mice. *Vaccine*. 19: 1931-1939.
- Medina, E. and Guzmán, C. A. (2001). Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potencial and limitations. *Vaccine*. 19: 1573 – 1580.
- Mercenier, A., Dutot, P., Kleinpeter, P., Aguirre, M., Paris, P., Reymund, J. and Slos, P. (1996). Development of lactic acid bacteria as live vectors for oral or local vaccines. *Adv. Food Sci.* 18: 73 - 77.
- Mercenier, A. (1999). Lactic Acid Bacteria as live vaccines. In: G. Tannock (Ed.). *Probiotics: A critical review*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. p. 113-127.
- Mercenier, A., Muller-Alouf, H. and Grangette, C. (2000). Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2: 17-25.
- Metchnikoff, E. (1908). The prolongation of life. *Optimistic studies*. G. P. Putman's Sons, New York, Londres.
- Meyers, M. Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella*. In: K. Nielsen & J. R. Duncan. *Animal Brucellosis*. CRC Press 1990. p. 1 - 17.
- Michaux-Charachon, S., Paillisson, J., Carles-Nurit, M. J., Bourg, G., Allaredet-Servent, A. and Ramuz, M. (1993). Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J. Bacteriol.* 175: 701-705.

- Millar, D. G., Hirst, T. R. and Snider, D. P. (2001). Heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. *Infect. Immun.* 69: 3476-3482.
- Miyoshi, A., Poquet, I., Azevedo, V., Commissaire, J., Bermudez-Humaran, L., Domakova, E., Le Loir, Y., Oliveira, S.C., Gruss, A. and Langella, P. (2002). Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3141-3146.
- Morbidity and Mortality Weekly Report – Center for Disease Control and Prevention. (1998). Human exposure to *Brucella abortus* strain RB51.
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsh, M., Wolters, J., Bush, M. and Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class proteobacteria. *J. Bacteriol.* 172: 3569-3576.
- Mrsny, R. J., Daugherty, A. L., McKee, M. L. and FitzGerald, D. J. (2002). Bacterial toxins as tool for mucosal vaccination. *DDI. Rev.* 7: 247-258.
- Neumann, E., Oliveira, M. A. P., Cabral, C. M., Moura, L. N., Nicoli, J. R., Vieira, E. C., Cara, D. C., Podoprigora, G. I. and Vieira, L. Q. (1998). Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz. J. Biol. Res.* 31: 1565-1573.
- Nicoli, J. R. and Vieira, L. Q. (2000). Probióticos, Prebióticos e Simbióticos. *Ciências Hoje.* 28: 34-38.

- Nicoletti, P. and Milward, F. W. (1983). Protection by oral vaccination of *Brucella abortus* strain 19 against an oral challenge with a pathogenic strain. *Am. J. Vet. Res.* 44: 1641.
- Norton, P. M., Brown, H. W. G. and Le Page, R. W. F. (1994). The immune response to *Lactococcus lactis*: implications for its use as a vaccine delivery vehicle. *FEMS Microbiol. Let.* 120: 249-256.
- 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.* 40: 225-230.
- Norton, P., Brown, H. W. G., Wells, J. M., Macpherson, A. M., Wilson, P. W. and Le Page, R. W. F. (1996). Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in *Lactococcus lactis*. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 14: 167-177.
- Oñate, A. A., Vemulapalli, R., Andrews, E., Schurig, G. G., Boyle, S. and Folch, H. (1999). Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. *Infect. Immun.* 67: 986-988.
- Oliveira, S. C. and Splitter, G. (1994). Subcloning and expression of the *Brucella abortus* L7/L12 ribosomal gene and T-lymphocyte recognition of the recombinant protein. *Infect. Immun.* 62: 5201-5204.
- Oliveira, S. C., Zhu, Y. and Splitter, G. (1994). Sequences of the *rplJL* operon containing the L10 and L7/L12 genes from *Brucella abortus*. *Gene.* 140: 137-138.

- Oliveira, S. C. and Splitter, G. A. (1995). CD8⁺ type 1 CD44^{hi} CD45Rb^{lo} T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II- deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 25: 2551-2557.
- Oliveira, S. C. and Splitter, G. A. (1996). Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine.* 14: 959-962.
- Oliveira, S. C., Harms, J. S., Banai, M. and Splitter, G. A. (1996). Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and Gamma-interferon secretion by CD4⁺ T cells from *Brucella*-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized Guinea pigs. *Cell Immunol.* 172: 262-268.
- Oliveira, S. C., Harms, J. S., Rech, E. L., Rodarte, R. S., Bocca, A. L., Góes, A. M. and Splitter, G. A. (1998). The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31: 77-84.
- Oliveira, S. C., Soeurt, N., Splitter, G. (2002). Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet. Microbiol.* 90: 417-424.
- O'Sullivan, M. G. (1992). Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends Food Sci. Tech.* 3: 309-314.
- Perdigón, G., Fuller, R. and Raya, R. (2001). Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2: 27-42.

- Perez-Martinez, G., Kok, J., Venema, G., van Dijk, J. M., Smith, H. and Bron, S. (1992). Protein export elements from *Lactococcus lactis*. *Mol. Gen. Genet.* 234: 401-411.
- 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.
- Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E. and Gorvel, J. (2000). Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microb. Infect.* 2: 829-835.
- Pizza, M., Giuliani, M. M., Fontana, M. R., Monaci, E., Douce, G., Dougan, G., Mills, K.H.G., Rappuoli, R. and Del Giudice, G. (2001). Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine.* 19: 2534-2541.
- Poquet, I., Ehrlich, S. D. and Gruss, A. (1998). An export-specific reporter designed for Gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 180: 1904-1912.
- Pouwels, P. H., Leer, R. J., Shaw, M., den Bak-Glashouwer, M. J. H., Tielen, F. D., Smit, E., Martinez, B., Jore, J. and Conway, P. L. (1998). Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 155-167.
- Pozzi, G., Contorni, M., Oggioni, M. R., Manganelli, R., Tommasino, M., Cavaliere, F. and Fischetti, V. (1992). Delivery and expression of heterologous antigen on the surface of Streptococci. *Infect. Immun.* 60: 1902-1907.
- Que, Y. A., Haefliger, J. A., Francioli, P. and Moreillon, P. (2000). Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* using a new shuttle vector. *Infect. Immun.* 68: 3516-3522.

- Reveneau, N., Geoffroy, M. C., Loch, 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.
- Ricci, S., Medaglini, D., Rush, C. M., Marcello, A., Peppoloni, S., Manganelli, R., Palú, G. and Pozzi, G. (2000). Immunogenicity of the B monomer of *Escherichia coli* heat-labile toxin expressed on the surface of *Streptococcus gordonii*. *Infect. Immun.* 68: 760 - 766.
- Ribeiro, L. A., Azevedo, V., Le Loir, Y., Oliveira, S. C., Dieye, Y., Piard, J., Gruss, A. and Langella, P. (2002a). Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis* : first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 910-916.
- Ribeiro, L. A., Azevedo, V., Lê Loir, Y., Pontes, D., Oliveira, S. C., Dieye, Y., Piard, J., Gruss, A. and Langella, P. (2002b). Production et sécrétion de L7/L12, un antigène de *Brucella abortus*, chez *Lactococcus lactis*: vers de nouveaux vaccins oraux anti-brucellose? *Sciences des Aliments.* 22: 199-208.
- Roberfroid, M. B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1682-1687.
- Robinson, K., Chamberlain, L. M., Schofield, K. M., Wells, J. M. and Le Page, R. W. F. (1997). Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nature Biotech.* 15: 653-657.

- Rosinha, G. M. S., Miyoshi, A., Azevedo, V., Garry, S. and Oliveira, S. C. (2002a). Molecular and immunological characterization of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *J. Med. Microbiol.* 51: 661-671.
- Rosinha, G. M. S., Freitas, D. A., Miyoshi, A., Azevedo, V., Campos, E., Cravero, S. L., Rossetti, O., Garry, S. and Oliveira, S. C. (2002b). Cassete transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice. *Infect. Immun.* 70: 5036-5044.
- Salminen, S., Deighton, M. and Gorbach, S. (1993) Lactic acid bacteria in health and disease. In: S. Salminen and A. von Wright (Ed.). Lactic acid bacteria. Marcel Dekker Inc., New York, N. Y. p. 199-225.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M. and Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. J. Nutr.* 80: 147-171.
- Savelsbergh, A., Mohr, D., Wilden, B., Wintermeyer, W. and Rodnina, M. V. (2000). Stimulation of the GTPase activity of translation elongation factor G by ribosomal protein L7/L12. *J. Biol. Chem.* 14: 890-894.
- Scheppler, L., Vogel, M., Zuercher, A. W., Zuercher, M., Germond, J., Miescher, S. M. and Stadler, B. M. (2002). Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccines delivery vehicle. *Vaccine.* 20: 2913-2920

- Schleifer, K.H., and Kilpper-Galz, R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: a review. *Appl. Microbiol.* 10: 1-19
- Schotte, L., Steidler, L., Vandekerckhove, J. and Remaut, E. (2000). Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 761-765.
- Schurig, G. G., Roop, R. M., Bagchi, T., Boyle, S., Burhman, D. and Srirangathan, N. (1991). Biological properties of RB51. A stable strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28: 171 - 188.
- Schurig, G. G., Srirangathan, N. and Corbel, M. J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90: 479-496.
- Seegers, J. F. M. L. (2002). Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Rev. Trends Biotechnol.* 20: 508-515.
- Shata, M. L., Stevceva, L., Agwale, S., Lewis, G. K. and Hone, D. M. (2000) Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. Reviews. *Mol. Med. Today.* 6: 66-71.
- Shortle, D. (1983). A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. *Gene* 22: 181-189.
- Shu, Q. and Gill, H. S. (2002). Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20TM) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *Immunol. Med. Microbiol.* 34: 59-64.

- Sibakow, M., Koivula, T., von Wright, A. and Palva, I. (1991). Secretion of TEM beta-lactamase with signal sequences isolated from the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 341-348.
- Siegers, K. and Entian, K. D. (1995). Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1082-1089.
- Silva, C. L. (1999). The potential use of the heat shock proteins to vaccinate against mycobacterial infections. *Microbes Infect.* 1: 429-435.
- Simões, M. A. and Ferreira, L. C. S. (2001). Adjuvantes de mucosa. *Biotecnologia*. 19: 32-35.
- Simonen, M. and Palva, I. (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* 57: 109-137.
- Sinha, B., Francois, P., Que, Y. A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P., Lew, D., Krause, K. H., Peters, G. and Herrmann, M. (2000). Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect. Immun.* 68(12): 6871-6878.
- Smith, L. D. and Ficht, T. A. (1990). Pathogenesis of *Brucella*. *Crit. Rev. Microbiol.* 17: 209-230.
- Spink, W. N. and Thompson, H. (1953). Brucellosis caused by *Brucella abortus*, strains 19. *Am. Med. Assoc.* 153:1162-1165.
- Stackebrandt, E. and Teuber, M. (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 317-324.

- Steidler, L., Wells, J. M., Raeymaekers, A., Vandekerckhove, J., Fiers, W. and Remaut, E. (1995). Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1627-1629.
- 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.
- Stevens, M. G., Olsen, S. C., Palmer, M. V. and Pugh-Jr, G. W. (1996). Immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated orally with *Brucella abortus* RB51. *Infect. Immun.* 64:4534-4541.
- Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food. Microbiol.* 36: 1-29.
- 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.
- Thole, J. E. R., van Dalen, P. J., Havenith, C. E. G., Pouwels, P. H., Seegers, J. F. M. L., Tielen, F. D., van der Zee, M. D., Zegers, N. D. and Shaw, M. (2000). Live bacterial delivery systems for development of mucosal vaccines. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2:94-99.
- Thompson, A. and Gasson, M. J. (2001). Location effects of a reporter gene on expression levels and on native protein synthesis in *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3434-3439.

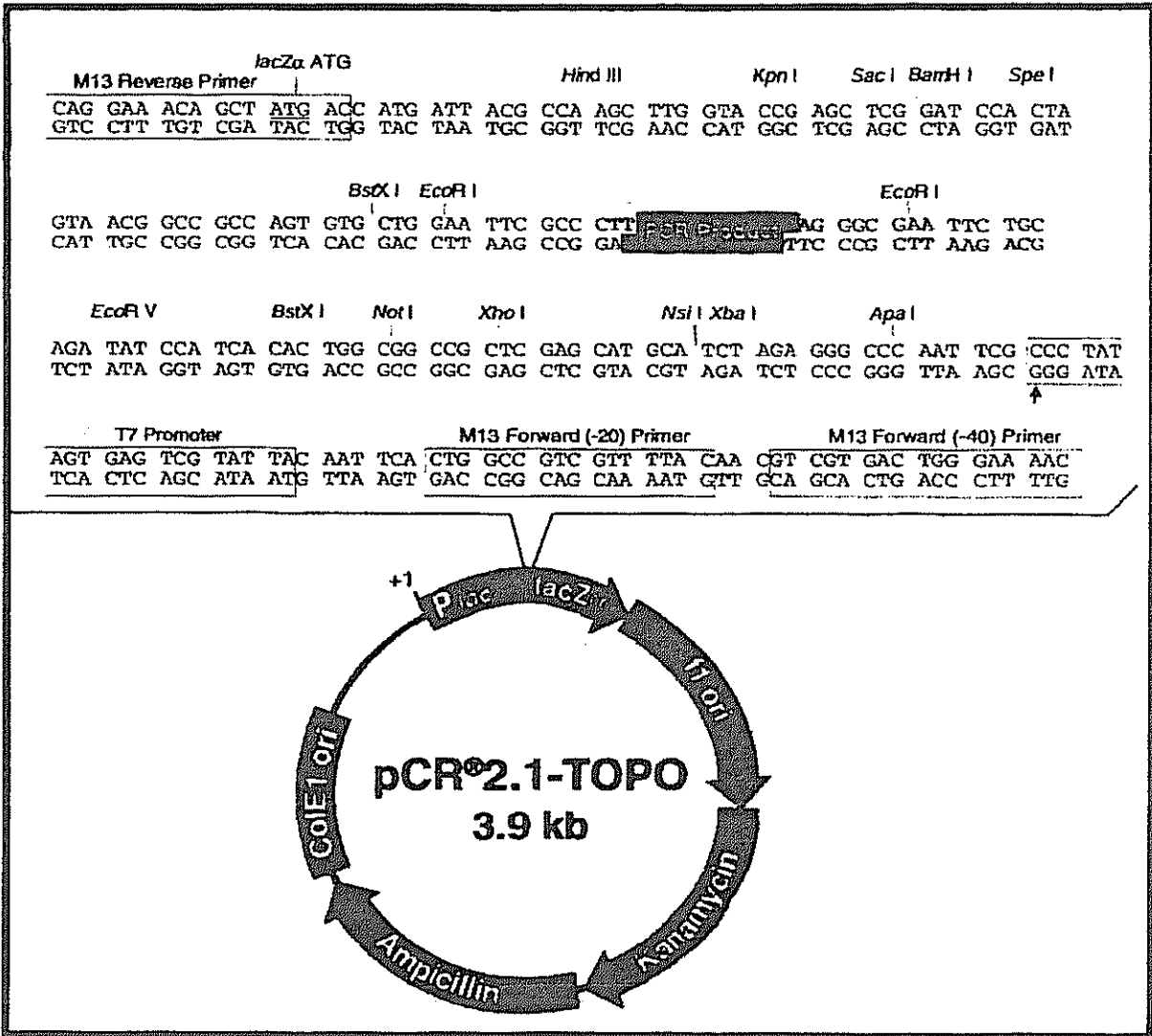
- Ton-That, H., Liu, G., Mazmanian, S. K., Faull, K. F. and Schneewind, O. (1999).** Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 12424-12429.
- Turner, O. C., Roberts, A. D and Frank, A. A., Phalen, S. W., McMurray, D. M., Content, J., Dennis, O., D'Souza, S., Tanghe, A., Huygen, K. and Orme, I. M. (2000).** Lack of protection in mice and necrotizing bronchointerstitial pneumonia with bronchiolitis in guinea pigs immunized with vaccines directed against the hsp60 molecule of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 68: 3674:3679.
- Ugalde, R.A. (1999).** Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, and endosymbionts. *Microb. Infect.* 1: 1211-1219.
- van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M., Siezen, R. J., de Vos, W. M. and Simons, G. (1990).** Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of *usp45*, a gene encoding a highly secreted protein from *Lactococcus lactis* MG1363. *Gene.* 95: 155-160.
- van Asseldonk, M., de Vos, W. M. and Simons, G. (1993).** Functional analyses of the *Lactococcus lactis* *usp45* secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and heterologous alpha-amylase. *Mol. Gen. Genet.* 240: 428-434.
- van de Guchte, M., van der Vossen J. M., Kok, J. and Venema, G. (1989).** Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 224-228.

- van de Guchte, M., Kodde, J., van der Vossen J. M., Kok, J. and Venema, G. (1990). Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2606-2611.
- 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 Meer, J. R., Polman, J., Beerthuysen, M. M., Siezen, R. J., Kuipers, O. P. and de Vos, W. M. (1993). Characterization of the *Lactococcus lactis* Nisin A operon genes, *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in the precursor processing, and *nisR* encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175: 2578-2588.
- Vanet, A. and Labigne, A. (1998). Evidence for specific secretion rather than autolysis in the release of some *Helicobacter pylori* proteins. *Infect. Immun.* 66: 1023-1027.
- Velikovskiy, C. A., Cassataro, J., Giambartolomei, G. H., Goldbaum, F. ^a, Estein, S., Bowden, R. A., Bruno, L., Fossati, C. A. and Spitz, M. (2002). A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 70: 2507-2511.
- Vemulapalli, R., Duncan, A. J., Boyle, S. M., Sriranganathan, N., Toth, T. E. and Schurig, G. G. (1998). Cloning and sequencing of *yajC* and *secD* homologs of *Brucella abortus* and demonstration of immune responses to YajC in mice vaccinated with *B. abortus* RB51. *Infect. Immun.* 66: 5684-5691.

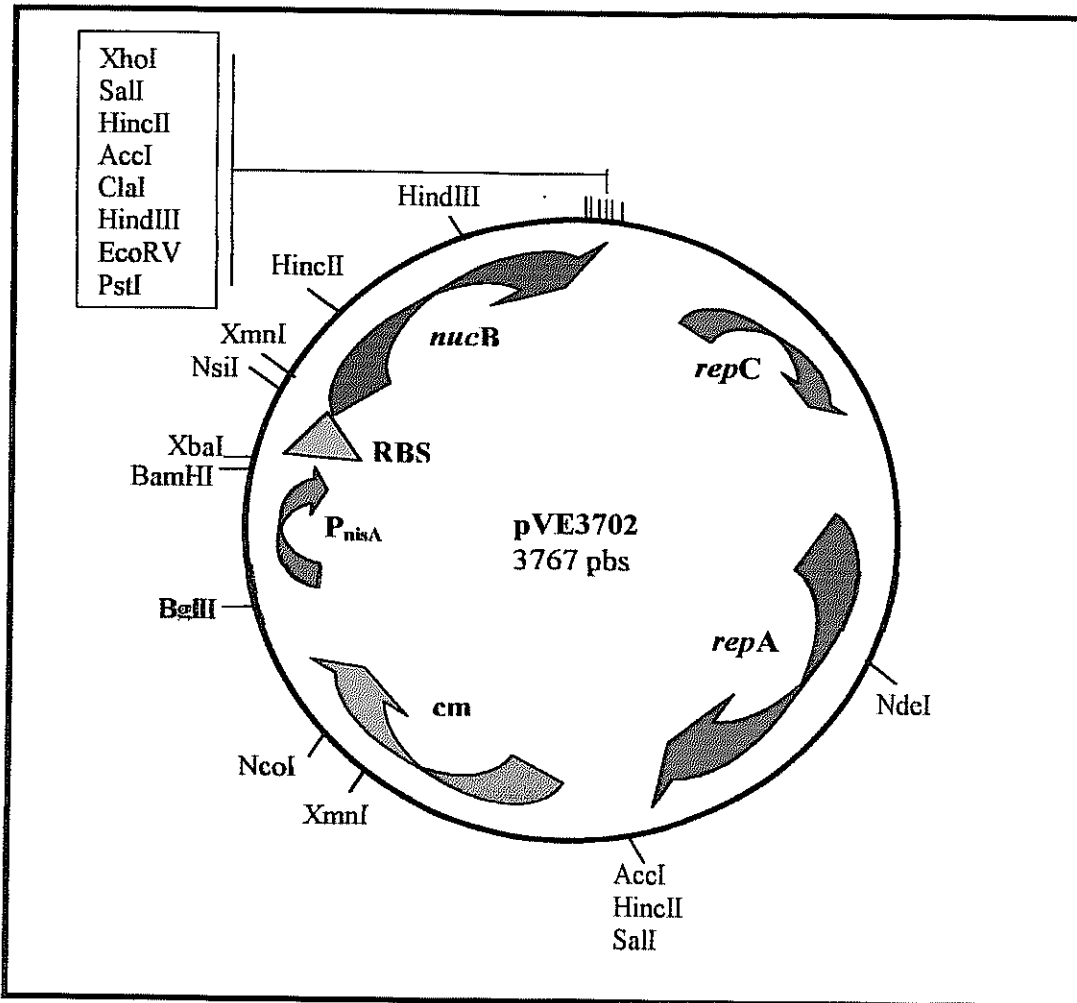
- Verger, J. M. (1971). Comparaison des doses infectieuses 50p. 100 (D150) de *Brucella melitensis* inoculées par les voies conjonctivale intragastrique et intrapéritonéale à la souris. *Ann. Rech. Vet.* 2: 185-196.
- Verger, J.M., Grimony, F., Grimont. P.A.D. and Grayon, M. (1985). *Brucella* A monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J.Syst. Bacteriol.* 35: 292 – 295.
- Vitini, E., Alvarez, E. V. S., Medina, M., Médici, M., de Budeguer, M. V. and Perdigón, G. (2000). Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell.* 24: 223-232.
- Xu, Z. and Sigler, P. B. (1998). GroEL/ GroES: Structure and function of a two-stroke folding machine. *J. Struc. Biol.* 124: 129 - 141.
- Waterfield, N. R., Le Page, R. W., Wilson, P. W. and Wells, J. M. (1995). The isolation of lactococcal promoters and their use in investigating bacterial luciferase synthesis in *Lactococcus lactis*. *Gene.* 165: 9-15.
- Wells, J. M., Wilson, P. W., Norton, P. M., Gasson, M. J. and Le Page, R. W. (1993a). *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol. Microbiol.* 8: 1155-1162.
- Wells, J. M., Wilson, P. W., Norton, P. M. and Le Page, R. W. (1993b). A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3954-3959.
- Wells, J. M., Norton, P. M. and Le Page, R. W. F. (1995). Progress in the development of mucosal vaccines based on *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.* p: 1071 - 1079. b

- Wells, J. M. and Pozzi, G. (1997). An overview of Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization. In: G. Pozzi and J. M. Wells (Ed.). Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization. Springer-Verlag and Landes Bioscience, Austin, Tex. p. 1-8.
- Wieden, H., Wintermeyer, W., Rodnina, M. V. (2001). A common structural motif in elongation factor Ts and ribosomal protein L7/L12 may be involved in the interaction with elongation factor Tu. *J. Mol. Evol.* 52: 129-136.
- WHO - World Health Organization. (1998). Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. The development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of a WHO Meeting, Geneva.
- Wolinowska, R., Ceglowski, P., Kok, J. and Venema, G. (1991). Isolation, sequence and expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* of the Dnase (streptodornase)-encoding gene from *Streptococcus equisimilis* H46A. *Gene.* 106(1): 115-119.
- Zhan, Y. and Cheers, C. (1998). Control of IL-12 and IFN- γ production in response to live or dead bacteria by TNF and others factors. *J. Immun.* 161: 1447-1453.
- Zegers, N. D., Kluter, E., van der Stap, H., Van Dura, E., van Dalen, P., Shaw, M. and Baillie, L. (1999). Expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* by *Lactobacillus casei*: towards the development of an oral vaccine against anthrax. *J. Appl. Microbiol.* 87: 309-314.

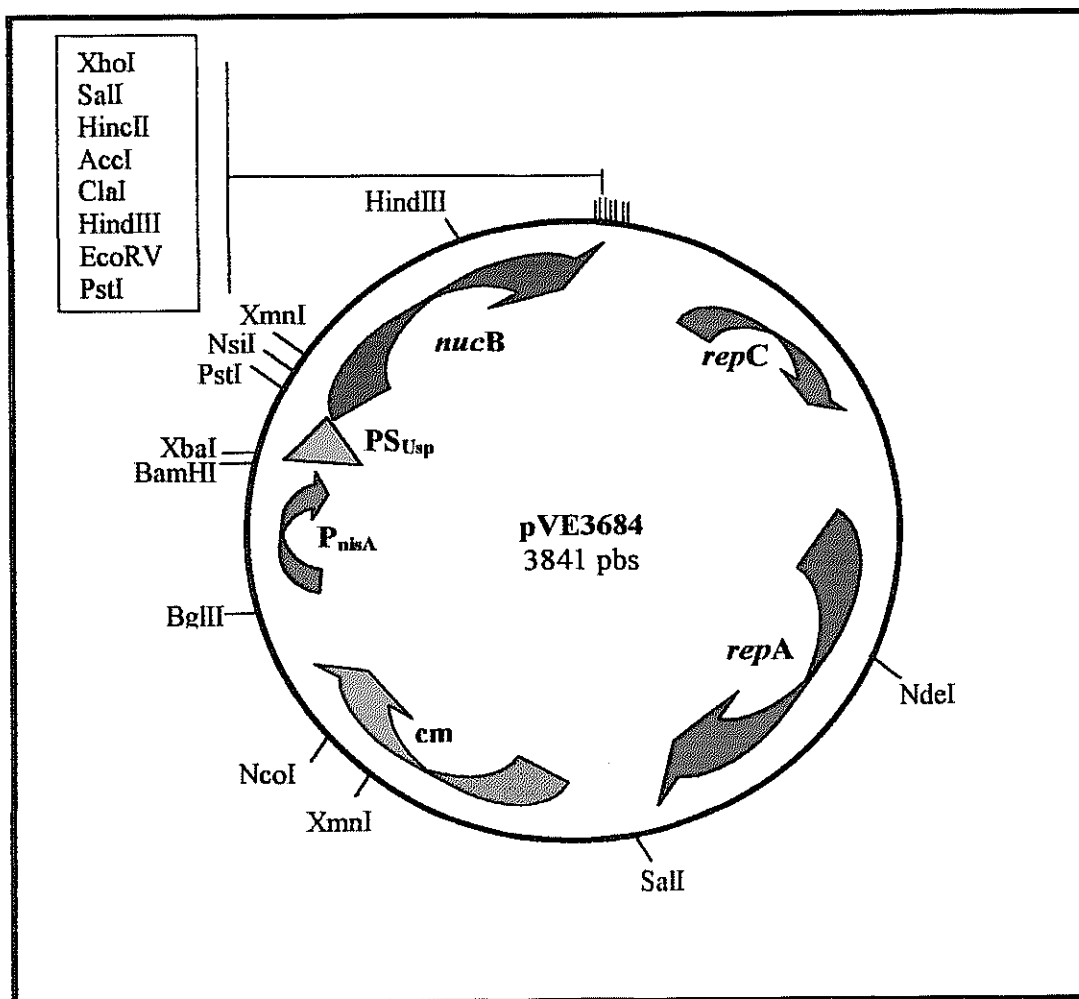
ANEXO A



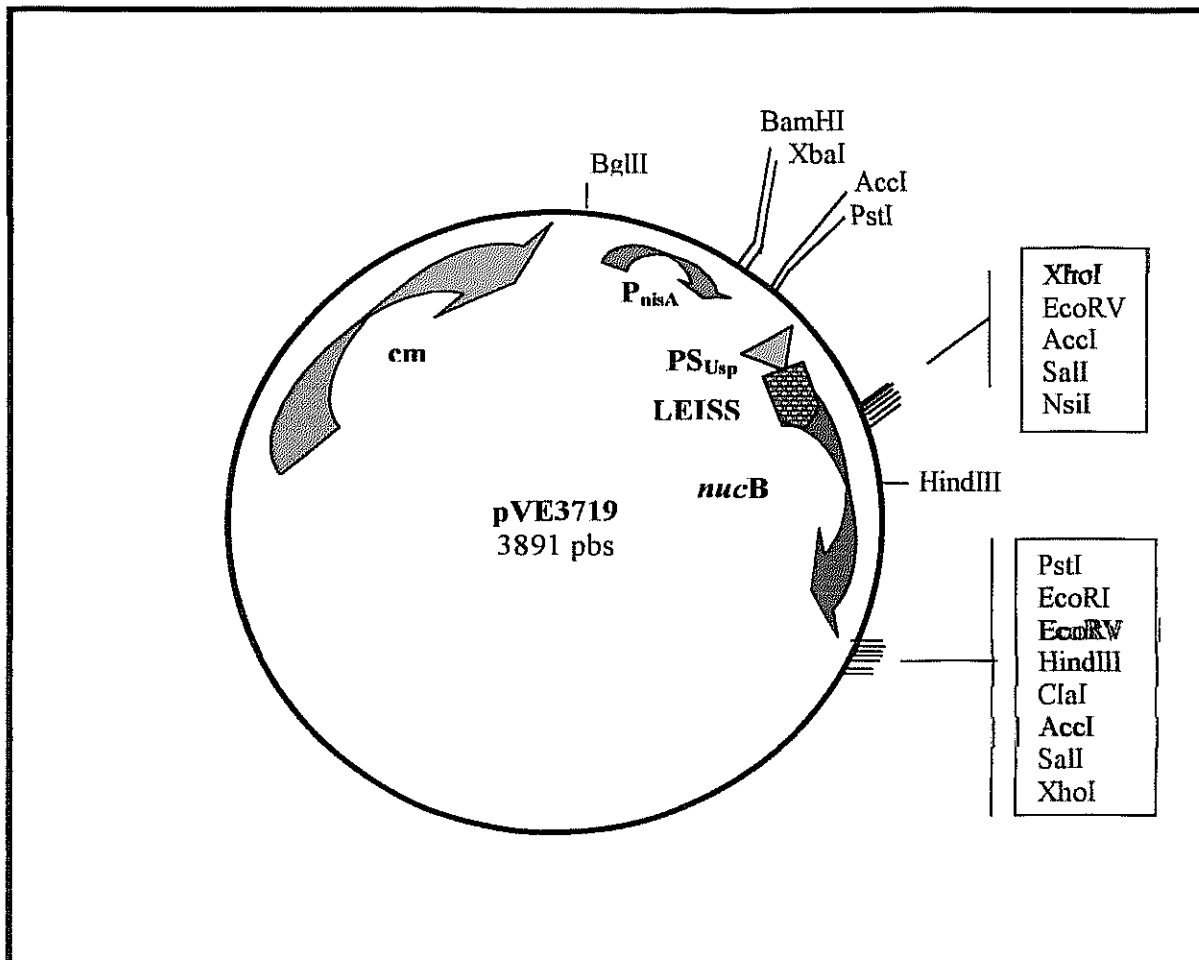
Mapa do plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen)



Mapa do plasmídeo pVE3702. pVE3702 possui 3.767 pbs. P_{nisA}, promotor induzido por nisina (▼); RBS, sítio de ligação do ribossomo do gene *usp45* (▼); *nucB*, sequência codificadora da proteína NucB (▼); *cm*, sequência que codifica resistência ao antibiótico cloramfenicol (▼).



Mapa do plasmídeo pVE3684. P_{nisA} , promotor induzido por nisina (▼); PS_{Usp} , peptídeo sinal de Usp45 (▽); *nucB*, sequência codificadora da proteína NucB (▼); *cm*, sequência que codifica resistência ao antibiótico cloramfenicol (▽).



Mapa do plasmídeo pVE3719. P_{nisA}, promotor induzido por nisina (▼); PS_{Usp}, peptídeo sinal de Usp45 (▼); nuc B, sequência codificadora da proteína NucB (▼); cm, sequência que codifica resistência ao antibiótico cloramfenicol (▼), LEISS, sequência que codifica um propeptídeo sintético (▼).

ANEXO B

**PUBLICAÇÕES, POSTER E PALESTRAS E CURSOS DURANTE ESTE
TRABALHO DE DISSERTAÇÃO**

Artigos completos publicados em periódicos

PONTES, D. S., DORELLA, F., RIBEIRO, L., LANGELLA, P., OLIVEIRA, S. C., AZEVEDO, V., LOIR, Y. L.
Bactérias Lácticas Produtoras de Antígenos. Biotecnologia. Brasil:, v.22, p.36 - 40, 2001.

RIBEIRO, L., AZEVEDO, V., LOIR, Y. L., PONTES, D. S., OLIVEIRA, S. C., DIEYE, Y., PIARD, J., GRUSS, A., LANGELLA, P.
Production et secretion de L7/L12, un antigene de Brucella abortus, chez Lactococcus lactis: vers de nouveaux vaccins oraux anti-brucellose?. Sciences Des Aliments. França, v.22, n.1, p.199 - 208, 2002.

Trabalhos completos publicados em anais de evento

PONTES, D. S., LANGELLA, P., DORELLA, F., RIBEIRO, L., MIYOSHI, A., GODARD, A. L. B., LOIR, Y. L., GRUSS, A., OLIVEIRA, S. C., AZEVEDO, V.
Induction of Mucosal Immune response after oral inoculation of mice with Lactococcus lactis producing Brucella abortus L7/L12 antigen. In: Seventh symposium on Lactic Acid Bacteria, 2002, Veldhoven.

PONTES, D. S., LANGELLA, P., RIBEIRO, L., DORELLA, F., MIYOSHI, A., LANGELLA, P., LOIR, Y. L., GRUSS, A., OLIVEIRA, S. C., AZEVEDO, V.
Expression of Brucella abortus immunodominant antigen L7/L12 in Lactococcus lactis: a new strategy of an oral vaccine against brucellosis In: 48 Congresso Nacional de Genética, 2002 In: 48 Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia.

PONTES, D. S., DORELLA, F., MIYOSHI, A., GODARD, A. L. B., RIBEIRO, L., LOIR, Y. L., LANGELLA, P., GRUSS, A., OLIVEIRA, S. C., AZEVEDO, V.
Expression of Brucella abortus immunodominant antigen L7/L12 in Lactococcus lactis: a new strategy of an oral vaccine against brucellosis. In: XXIII Reunião de Genética de Microorganismos, 2002, Pirinópolis.

MIYOSHI, A., I, P., E, D., J, C., HUMARAN, L. B., LOIR, Y. L., GODARD, A. L. B., PONTES, D. S., OLIVEIRA, S. C., GRUSS, A., AZEVEDO, V., LANGELLA, P.
Controlled production of stable heterologous proteins in Lactococcus lactis In: XXIII Reunião de Genética de Microorganismos In: XXIII Reunião de Genética de Microorganismos, 2002, Pirinópolis.

MUINHOS, R. G., PONTES, D. S., DORELLA, F., ZUCCONI, É., MIYOSHI, A., GODARD, A. L. B., OLIVEIRA, S. C., AZEVEDO, V. Vacina de DNA utilizando linhagem atenuada de *Salmonella typhimurium*: uma nova estratégia para o controle da esquistossomose In: 48 Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia.

MUINHOS, R. G., MELO, A. L., ZUCCONI, É., DORELLA, F., PONTES, D. S., MIYOSHI, A., GODARD, A. L. B., OLIVEIRA, S. C., AZEVEDO, V. Imunização oral utilizando linhagem vacinal de *Salmonella typhimurium* produtora do antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* In: XXIII Reunião de Genética de Microrganismos, 2002, Pirenópolis.

ZUCCONI, É., PONTES, D. S., DORELLA, F., MUINHOS, R. G., MIYOSHI, A., GODARD, A. L. B., OLIVEIRA, S. C., AZEVEDO, V. Imunização oral utilizando linhagem vacinal de *Salmonella typhimurium* produtora do antígeno Sm14 de *Schistosoma mansoni* In: 48 Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia.

ZUCCONI, É., MELO, A. L., MUINHOS, R. G., DORELLA, F., PONTES, D. S., MIYOSHI, A., GODARD, A. L. B., OLIVEIRA, S. C., AZEVEDO, V. Vacina de DNA utilizando linhagem atenuada de *Salmonella typhimurium*: uma nova estratégia para o controle da esquistossomose In: XXIII Reunião de Genética de Microrganismos, 2002, Pirenópolis.

PONTES, D. S., DORELLA, F., MIYOSHI, A., GODARD, A. L. B., RIBEIRO, L., LOIR, Y. L., LANGELLA, P., OLIVEIRA, S. C., GRUSS, A., AZEVEDO, V. Expression of *Brucella abortus* immunodominant antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: a new strategy of an oral vaccine against brucellosis. In: III Semana de Pós Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais, 2001, Belo Horizonte.

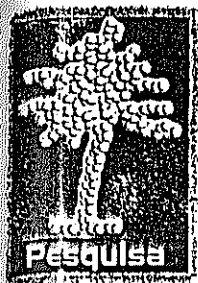
Palestras

PONTES, D.

Utilização de linhagens recombinantes de *Lactococcus lactis* produtoras de antígenos da *Brucella abortus* como vacinas vivas orais. (Palestrante). Curso de Genética Molecular Microbiana – Tópicos Especiais de Genética e Evolução II. 2002. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2001, Belo Horizonte.

PONTES, D.

Vacinas usando bactérias lácticas (Palestrante). SBG/UFPA, Belém do Pará-PA, 2001. (Simpósio, Participações em eventos)



Bactérias Lácticas PRODUTORAS DE ANTÍGENOS

Desenvolvimento de uma vacina oral contra a brucelose

1. Introdução

Brucella abortus é uma bactéria patogênica intracelular facultativa que infecta homens e animais domésticos. A *Brucella* é o agente etiológico da brucelose, doença que afeta aproximadamente 10% do rebanho bovino brasileiro. As manifestações patológicas da brucelose são diversas e incluem febre ondulante, artrite, endocardite e meningite em humanos, aborto e infertilidade em bovinos. O homem pode ser infectado pelo contato com animais infectados ou por ingestão de produtos lácteos contaminados. Desta forma, o controle da brucelose em animais domésticos é primordial para o seu controle em humanos.

Atualmente não existe uma vacina eficaz para o controle da brucelose humana. Entretanto para o controle da brucelose animal existe uma vacina comercial constituída de uma linhagem viva atenuada da bactéria, *B. abortus* (B19), que apresenta três grandes desvantagens: 1) pode causar aborto quando administrada em fêmeas gestantes; 2) é patogênica para humanos; 3) induz anticorpos em animais imunizados, interferindo no diagnóstico de populações infectadas. Uma outra linhagem atenuada da *B. abortus* (RB51), desprovida da cadeia "O" do lipopolissacarídeo, tem sido utilizada nos Estados Unidos e também pode causar aborto em fêmeas gestantes. Desta forma, o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e seguras constitui prioridade para uma diminuição significativa, ou mesmo erradicação, desta doença.

No caso da *Brucella abortus*, cuja infecção ocorre por via oral, o desenvolvimento de vacinas que induzem uma imunidade de mucosa é de grande interesse, uma vez que este tipo de

imunização pode levar à produção de imunoglobulinas IgA secretoras antígeno-específicas (sIgA) diretamente na principal via de entrada deste patógeno. A produção local de sIgA pode prevenir uma interação inicial do patógeno com a superfície da mucosa bloqueando a colonização e/ou invasão de células do hospedeiro, o que facilita a destruição das bactérias.

A estimulação da resposta imunológica de mucosa através da administração oral de antígenos solúveis é relativamente ineficiente. Isto se deve a vários fatores, como degradação rápida dos antígenos no estômago e/ou intestino, uma limitada absorção destes antígenos pelo organismo e o estabelecimento da tolerância imunológica, que bloqueia a ativação da resposta imunológica contra os antígenos ingeridos. Desta forma, várias estratégias visando uma eficiente apresentação de antígenos na mucosa têm sido desenvolvidas com o objetivo de minimizar estes problemas (Wells & Pozzi, 1997). Dentre elas, a utilização de bactérias patogênicas atenuadas pela engenharia genética como *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (Onate et al., 1999; Guillobel et al., 2000; Gentschev et al., 2001), têm sido testadas extensivamente. Entretanto, os riscos apresentados na utilização destes patógenos em crianças e particularmente em indivíduos imunodeficientes, têm estimulado o desenvolvimento de novas vacinas utilizando bactérias não patogênicas, comensais ou não, como veículos de liberação de antígenos.

Dentre as bactérias Gram-positivas, que estão sendo utilizadas como sistemas de liberação de antígenos, estão incluídas espécies não patogênicas de *Staphylococcus*, *Listeria* e bactérias

Luciana Ribeiro

Laboratoire de Génétique Appliquée, Unité de Recherches Laitières et de Génétique Appliquée, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, 79352 Jouy en Josas Cedex, France; Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte - MG, Brasil

Daniela Pontes

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte - MG, Brasil

Fernanda Dorella

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte - MG, Brasil

Philippe Langella

Laboratoire de Génétique Appliquée, Unité de Recherches Laitières et de Génétique Appliquée, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, 79352 Jouy en Josas Cedex, France

Yves Le Loir

Laboratoire de Génétique Appliquée, Unité de Recherches Laitières et de Génétique Appliquée, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, 79352 Jouy en Josas Cedex, France

Sérgio Costa Oliveira

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte - MG, Brasil

Vasco Azevedo

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte - MG, Brasil - vasco@monom.ich.ufmg.br

Foto cedida pelos autores

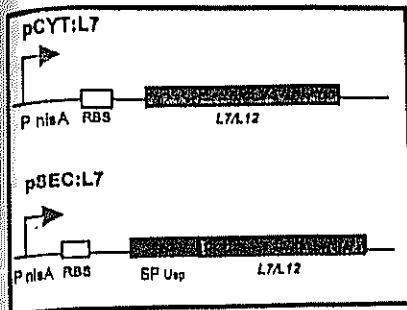
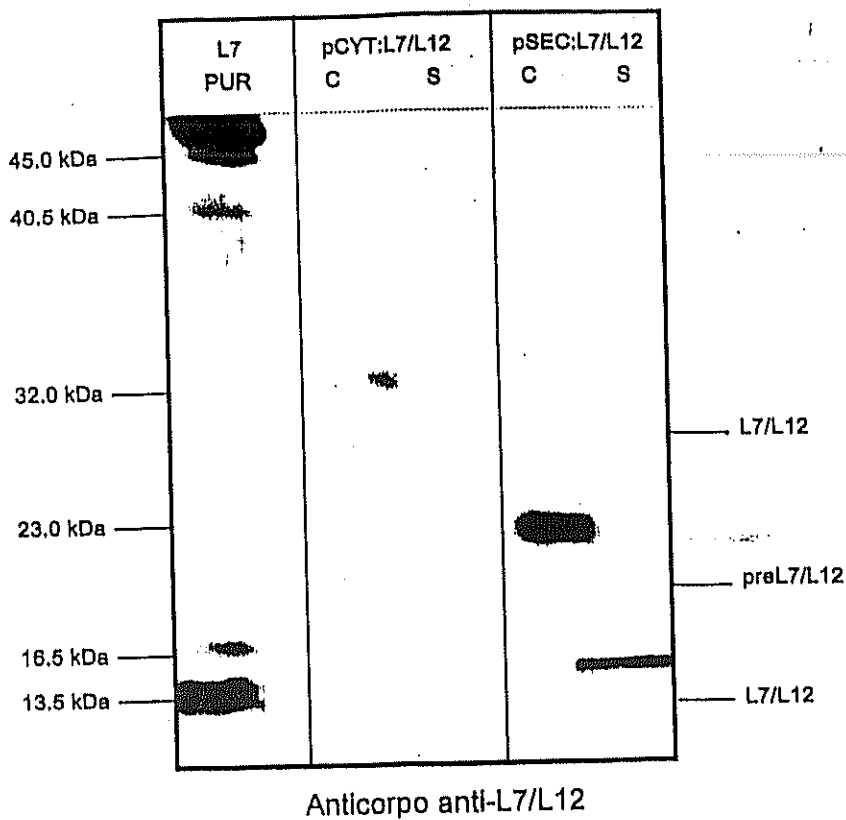


Figura 1. Produção intra e extracelular da proteína L7/L12 em *L. lactis*. Na fase exponencial, as culturas foram induzidas com nisina durante uma hora. Em seguida, foi realizada a extração de proteínas do citoplasma bacteriano (C) e do sobrenadante (S). A proteína purificada L7/L12 foi adicionada como padrão. Após SDS-PAGE, imunodeteção foi realizada com anticorpos anti-L7/L12. P_{nisA}: promotor nisina; RBS: sítio de ligação ao ribossomo; SP_{usp}: peptídeo sinal do gene *Usp45*



Anticorpo anti-L7/L12

láticas (BL) como *Lactococcus lactis*, *Streptococcus gordonii* e *Lactobacillus fermentum*. A utilização das BL é uma alternativa aos problemas acarretados pelo uso de bactérias patogênicas atenuadas, como: virulência residual, risco de reversão e reação cruzada no teste de diagnóstico.

As BL são utilizadas pela indústria nos processos fermentativos de produtos agro-alimentares, são inócuas (consideradas como GRAS – Generally Regarded As Safe), são ingeridas vivas em grandes quantidades e algumas espécies sobrevivem dentro do intestino do hospedeiro, onde elas podem exercer várias atividades probióticas. A partir do início dos anos 90, novas idéias de como utilizar as bactérias lácticas surgiram, como, por exemplo, a possibilidade de produzir proteínas de interesse vacinal (antígenos e citocinas). Elas podem ser utilizadas como vacinas vivas, pois possuem os pré-requisitos preconizados pela OMS (Organização Mundial da Saúde) tais como: facilidade de administração (oral), baixo custo e possibilidade de serem administradas em forma de coquetéis para o controle de diferentes

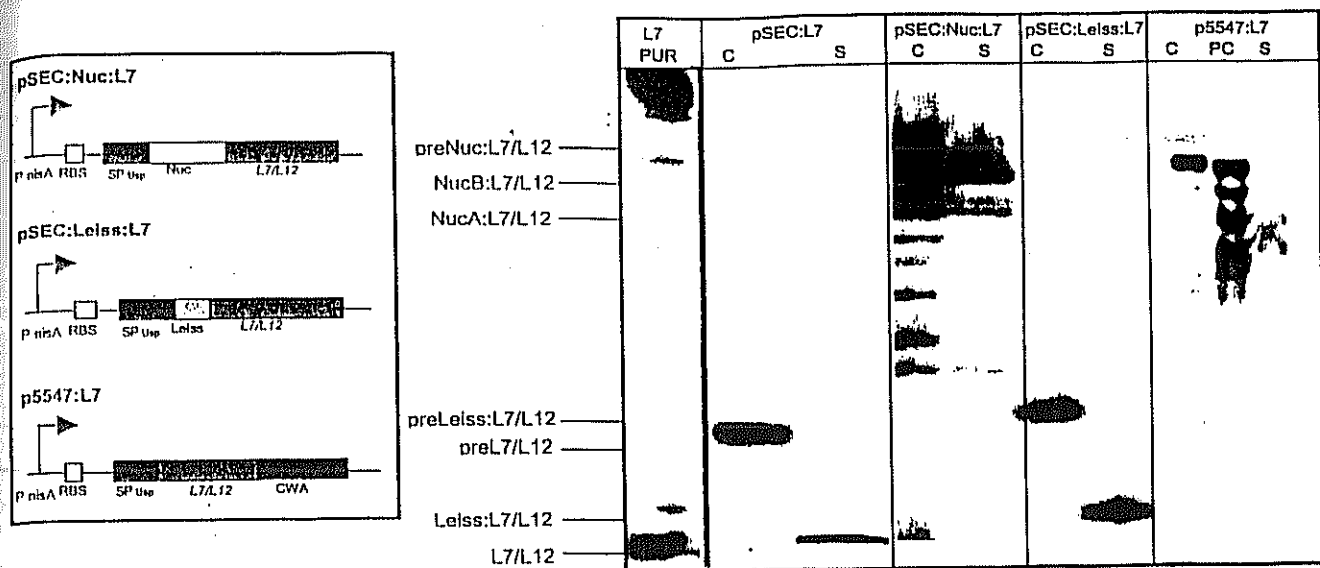
enfermidades.

Vários antígenos bacterianos e virais já foram produzidos em *Lactococcus lactis*, o organismo modelo para as BL (Wells *et al.*, 1995; Langella & Le Loir, 1999; Gilbert *et al.*, 2000). Em alguns casos, a imunogenicidade e proteção foram observadas nos diferentes sistemas utilizados (Enouf *et al.*, 2001; Norton *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1997). O primeiro trabalho demonstrando imunidade protetora foi feito em 1997, quando administraram-se oralmente linhagens recombinantes de *L. lactis*, produtoras do fragmento C da toxina do tétano (TTFC), em camundongos C57BL/6 (Robinson *et al.*, 1997). Estes resultados sugerem a viabilidade do uso das BL como veículo de apresentação de antígenos. Entretanto, uma resposta imune protetora depende não somente do veículo e do antígeno mas também da localização na bactéria onde estas moléculas serão produzidas. Em alguns casos, a secreção do antígeno pode ser de interesse biológico, pois permite o contato direto entre o antígeno e a superfície da mucosa o que facilitaria a indução de uma resposta imune.

Nossa equipe, composta de pesquisadores brasileiros (UFMG – Departamento de Biologia Geral e de Bioquímica e Imunologia) e franceses (INRA – Institut National de la Recherche Agronomique), tem como objetivo expressar antígenos da *Brucella abortus* e de outros patógenos utilizando linhagens de *Lactococcus lactis*. Vários antígenos da *Brucella* já foram descritos e caracterizados mas, até o momento a proteína ribossômica L7/L12 (Oliveira & Splitter, 1996a) é o antígeno mais bem caracterizado imunologicamente. A proteína ribossômica L7/L12 possui a capacidade de induzir, quando injetada por via intraperitoneal em camundongos, uma resposta imune celular (essencial contra infecções causadas por patógenos intracelulares, como a *B. abortus*) e proteção (Oliveira & Splitter, 1996a; Oliveira *et al.*, 1996b; Kurar & Splitter, 1997).

2. Produção do antígeno L7/L12 em *Lactococcus lactis*

A utilização do promotor induzível P_{nisA} tem resultado em níveis altos de



Anticorpo anti-L7/L12

Figura 2. Aumento da produção da proteína L7/L12 em *L. lactis*. Immunodeteção da proteína produzida com anticorpos anti-L7/L12. Para a linhagem contendo a forma ancorada da proteína L7/L12 (p5547:L7), a extração de proteínas foi realizada nas frações celular (C), parede celular (PC) e sobrenadante (S). A proteína purificada L7/L12 foi adicionada como padrão. *P_{nisA}*: promotor nisina; RBS: sítio de ligação ao ribossomo; SP_{usp}: peptídeo sinal do gene *Usp45*; Nuc: nuclease de *S. aureus*; Leiss: pro-peptídeo sintético LEISSTCDA; CWA: região de ancoramento da proteína M6 de *S. pyogenes*

produção de proteínas heterólogas em *L. lactis*. Além disso a utilização de promotor constitutivo pode gerar problemas na expressão de antígenos. Portanto, o promotor *P_{nisA}* foi o escolhido para a produção da proteína L7/L12. Decidimos expressar esta proteína em três diferentes localizações celulares: citoplasma, meio extracelular e parede celular. Apesar de já ter sido demonstrado que *L. lactis* é capaz de produzir precisamente antígenos nestas três localizações, é necessário a determinação de qual forma de exposição seria mais eficiente para a vacinação oral com L7/L12 (Chamberlain et al., 1997; Wells et al., 1995).

O interesse em produzir a proteína L7/L12 no citoplasma da *L. lactis* deve-se ao fato de que esta forma é a que tem mais relatos, na literatura científica, de indução de resposta imune e proteção contra diferentes patógenos. A hipótese levantada é que o antígeno estaria protegido contra a ação de proteases existentes no trato digestivo superior e somente no momento da lise da bactéria, durante a sua passagem pelo intestino, este seria liberado e apresentado ao sistema imune. Através da análise por *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-L7/L12, verificamos uma produ-

ção citoplasmática desta proteína (0,5 mg/l) com a formação de dímeros (24 KDa ao invés de 12 kDa) (Fig 1).

Em seguida construímos, através da engenharia genética, linhagens de *L. lactis* para exportar L7/L12 para o meio extracelular. Nossos resultados mostraram um aumento de 6 vezes na produção total da proteína em comparação à produção intracelular (de 0,5 para 3,0 mg/l) e uma eficiência de secreção de 35% (Fig. 1). Uma possível explicação para este aumento na produção é que o reconhecimento do precursor preL7/L12 pela maquinaria de secreção de *L. lactis* ajudaria a evitar proteólise intracelular.

Com o objetivo de aumentar a eficiência de secreção da proteína L7/L12 duas estratégias foram testadas. A primeira foi a de fusionar o nosso antígeno com a nuclease (Nuc) de *Staphylococcus aureus*. Nuc, é altamente estável, naturalmente secretada e tem sido utilizada em fusão traducional para melhorar a exportação de proteínas heterólogas em *L. lactis* (Piard et al., 1997; Poquet et al., 1998; Langella & Le Loir, 1999; Bermudez-Humarán et al., 2001). Entretanto, nossos resultados mostraram que a eficiência de secreção foi similar

entre Nuc:L7/L12 e L7/L12 (38% e 35%, respectivamente, Fig. 2) e que o principal efeito desta fusão foi o aumento de 2,5 vezes na produção total da proteína (de 3,0 para 8,0 mg/l).

A segunda estratégia foi a fusão de L7/L12 com o propeptídeo LEISSTCDA (Leiss), que já foi demonstrado que é capaz de induzir um aumento da secreção de proteínas heterólogas em *L. lactis* (Le Loir et al., 1998, 2001). Leiss altera a carga da extremidade N-terminal da proteína de fusão introduzindo duas cargas negativas nas posições +2 e +8. Esta modificação na região N-terminal de proteínas maduras pode favorecer a eficiência de secreção destas proteínas por meio de dois possíveis mecanismos: facilitando o processamento das proteínas por meio de chaperoninas citoplasmáticas, devido à uma melhor conformação do precursor; ou promovendo um balanço de cargas no sítio de clivagem das proteínas, facilitando a sua translocação (Le Loir et al., 1998). Este último mecanismo deve-se ao fato de que a presença de cargas positivas na extremidade N-terminal de proteínas maduras pode associar-se com os ácidos teiônicos aniônicos presentes na superfície celular das bactérias Gram-positivas, via

interações eletrostáticas, interferindo na translocação e, portanto, na secreção destas proteínas.

Observamos dois fenômenos, o primeiro, não esperado, aumento da produção total da proteína L7/L12 de 3 mg/l, para 8 mg/l de L7/L12 fusionada com Leiss. O segundo, esperado, o aumento de 4 vezes da eficiência de secreção de Leiss:L7/L12 quando comparada a sua forma não fusionada (4 mg/l vs. 1 mg/l) (Fig. 2). Em resumo, a produção e a secreção da proteína L7/L12 em *L. lactis* foi otimizada através de fusões na região N-terminal com uma proteína heteróloga naturalmente secretada (Nuc) ou com um propeptídeo sintético (Leiss).

Em relação as construções onde os antígenos são apresentados na parede celular, estas podem apresentar duas possíveis vantagens em ensaios de imunização: 1) a parede celular bacteriana pode apresentar uma atividade adjuvante, podendo aumentar a resposta imune (Vitini et al., 2000), 2) a proteína uma vez ancorada na parede celular pode ser menos exposta à agentes degradantes ou desnaturantes presentes no estômago dos homens e animais (Dieye et al., 2001).

Para conseguirmos ancorar a proteína L7/L12 na parede celular de *L. lactis* o gene codificador desta foi fusionado a região de ancoramento (Cell Wall Anchor - CWA) da proteína M6 de *Streptococcus pyogenes*. A produção de L7/L12:CWA_{M6} foi analisada por *immunoblotting* nas três localizações celulares: citoplasma, parede celular e sobrenadante (Fig. 2). Cerca de 40% da proteína de fusão L7/L12:CWA_{M6} foi encontrada na parede celular e os outros 60% permaneceram não processadas no citoplasma, correspondendo ao precursor pre-L7/L12:CWA_{M6}. Duas bandas fracas foram detectadas no sobrenadante, correspondendo à L7/L12:CWA_{M6} que se liberaram da parede celular. Este resultado é semelhante ao de outros grupos que conseguiram ancorar proteínas em *L. lactis*.

3. Primeiros ensaios de imunização em camundongos

Nos primeiros ensaios de imunização foram testadas todas as construções citadas acima. Os protocolos e o esquema de vacinação foram adaptados a partir do artigo de Robinson *et al* (1997) e são apresentados na figura 3.

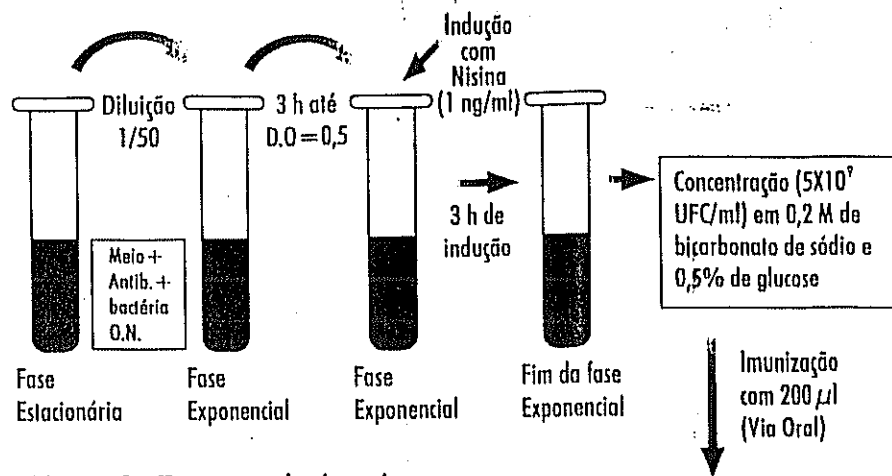


Figura 3. Esquema de imunização utilizando *L. lactis* expressando a proteína L7/L12 administrada em camundongos pela via oral. Cultura de *L. lactis* produzindo a proteína L7/L12, foram crescidas em meio de cultura M17 adicionado de 0,5% de glucose mais antibiótico adequado. Após 16 horas de cultura, estas foram diluídas (proporção 1:50) e crescidas em meio de cultura até atingir uma absorbância de 0,5 (600 nm) onde foi adicionado 1 ng/ml de nisina. Após 3 horas de indução, as bactérias foram centrifugadas e resuspendidas em 0,2 M de



bicarbonato de sódio e 0,5% de glucose. Camundongos foram imunizados via oral com uma concentração de 5×10^9 UFC/ml. Os animais foram imunizados em três períodos diferentes durante três dias consecutivos (dias 0, 1, 2; 14,15,16; 28,29,30)

Amostras de fezes de camundongos BALB-c foram coletadas e testes de ELISA foram realizados para avaliação dos níveis de IgA nas fezes o que nos permitiu determinar quais das linhagens eram capazes de induzir uma resposta imune específica nos animais imunizados. O grupo vacinado com a linhagem pCYT:L7/L12 foi o que apresentou níveis significativos de IgA nas fezes, ao contrário dos demais grupos. Desta forma, selecionamos a linhagem pCYT:L7/L12 para novos experimentos de imunização onde utilizamos adjuvantes de mucosa para potencializar a resposta imune. Testamos três tipos de adjuvantes. O primeiro um derivado atóxico da toxina termo-lábil (LT), denominada LT_(1192G) produzida por uma linhagem mutante de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC). A utilização de LT em preparações vacinais contra diferentes patógenos foi capaz de induzir uma resposta humoral sistêmica

e de mucosa contra os antígenos co-administrados. Ao lado da toxina colérica (CT) da *Vibrio cholerae*, o LT é o composto que mais se destaca na indução de resposta imune de mucosa. O segundo, uma linhagem de *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus* UFV-H2b20) que é um forte candidato a ser usado como probiótico, pois além de conseguir sobreviver as condições estressantes do trato gastrointestinal, esta bactéria também estimula o sistema fagocítico do hospedeiro através da produção de altos níveis de IL-12. O terceiro uma linhagem de *L. lactis* recombinante que secreta IL-12 murina ativa. IL-12 vem sendo co-administrada com vacinas de segunda (proteína recombinante) e terceira geração (vacinas de DNA) e foi demonstrado que a utilização desta citocina induz um aumento da resposta antígeno-específica. Obtivemos, neste primeiro ensaio

usando estes adjuvantes, resultados marcantes. Sendo a *L. lactis* secretora de H-12 f a que induziu a maior resposta de anticorpos secretores (sIgA) (resultados não apresentados). Um novo experimento com L7/L12 com estes adjuvantes esta sendo feito neste momento.

4. Conclusões

Esta é a primeira vez que o antígeno ribossômico L7/L12 da *B. abortus*, é expresso e produzido em *L. lactis*, bactéria láctica amplamente utilizada em processos de fermentação de produtos agro-alimentar.

Nossos resultados confirmaram a capacidade de *L. lactis* de dirigir a expressão de proteínas heterólogas, de forma estável, em diferentes compartimentos celulares (ou seja, citoplasma, parede celular e no meio externo). Os vetores construídos permitiram otimizar a produção da proteína L7/L12, assim como, aumentar sua eficiência de secreção. Determinamos que a localização citoplasmática do antígeno L7/L12 é a que deve ser utilizada como veículo de apresentação desta proteína em uma estratégia de vacinação oral, que adjuvantes potencializam a resposta imune contra este antígeno e iremos começar testes de proteção para demonstrar que este novo tipo de vacina é eficaz contra a brucelose experimental.

Agradecimentos:

Este projeto é apoiado pelo programa CAPES/COFECUB do Ministério da Educação. Luciana Ribeiro e Daniela Pontes contribuíram equitativamente neste trabalho.

REFERÊNCIAS

Bermúdez-Humarán, L. G., P. Langella, A. Gruss, R. Montes de Oca-Luna, and Y. Le Loir. 2001. Production of Human Papillomavirus Type 16E7 Protein in *Lactococcus lactis*. Submetido para publicação.

Chamberlain, L., J. M. Wells, R. Robinson, K. Schofield, and R. Le Page. 1997. Mucosal immunization with recombinant *Lactococcus lactis*, p. 83-106. In G. Pozzi and J. M. Wells (ed.), Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization. Springer-Verlag and Landes Bioscience,

Austin, Tex.

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

Enouf, V., P. Langella, J. Commissaire, J. Cohen, and G. Corthier. 2001. Bovine rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1423-1428.

Gentschev, I., Dietrich, G., Spreng, S., Kolb-Maurer, A., Binkmann, V., Grode, L., Hess, J., Kaufmann, S. H., Goebel, W. 2001. Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunits vaccines. *Vaccine.* 21: 19(17-19):2621-8.

Gilbert, C., K. Robinson, R. W. Le Page, and J. M. Wells. 2000. Heterologous expression of an immunogenic pneumococcal type 3 capsular polysaccharide in *Lactococcus lactis*. *Infect. Immun.* 68:3251-3260.

Guillobel H. C., J. I. Carinhonha, L. Cardenas, J. D. Clements, D. F. de Almeida, and L. C. Ferreira. 2000. Adjuvant activity of a nontoxic mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin on systemic and mucosal immune responses elicited against a heterologous antigen carried by a live *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strain. *Infect. Immun.* 68:4349-4353.

Kurar, E., and G. A. Splitter. 1997. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicit immune response. *Vaccine* 15: 1851-1857.

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

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

Le Loir, Y., S. Nouaille, J. Commissaire, L. Brétigny, A. Gruss et P. Langella. 2001. Signal peptide and propeptide optimisation for protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, n. 9.

Norton, P. M., J. M. Wells, H. W. Brown, A. M. Macpherson, and R. W. Le Page. 1997. Protection against

tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* 15:616-619.

Oliveira, S. C., and G. A. Splitter. 1996a. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine* 14:959-962.

Oliveira, S. C., J. S. Harms, M. Banai, and G. A. Splitter. 1996b. Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4+ T cells from *Brucella*-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. *Cell. Immunol.* 172:262-268.

Onate, A. A., R. Vemulapalli, E. Andrews, G. G. Schurig, S. Boyle, and H. Folch. 1999. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. *Infect Immun.* 67:986-988.

Piard, J.-C., R. Jimenez-Diaz, V. A. Fischetti, S. D. Ehrlich, and A. Gruss. 1997. The M6 protein of *Streptococcus pyogenes* and its potential as a tool to anchor biologically active molecules at the surface of lactic acid bacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 418:545-550.

Poquet I., S. D. Ehrlich, and A. Gruss. 1998. An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 180:1904-1912.

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

Vitni, E., S. Alvarez, M. Medina, M. Medici, M.V. de Budeguer, and G. Perdigon. 2000. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* 24:223-232.

Wells, J. M., P. M. Norton, and R. W. F. Le Page. 1995. Progress in the development of mucosal vaccines based on *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy Journal* 5:1071-1079.

Wells, J. M., and G. Pozzi. 1997. An overview of gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization, p. 1-8. In G. Pozzi and J. M. Wells (ed.), Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization. Springer-Verlag and Landes Bioscience, Austin, Tex. †

Production et sécrétion de L7/L12, un antigène de *Brucella abortus*, chez *Lactococcus lactis* : vers de nouveaux vaccins oraux anti-brucellose ?

Luciana A. RIBEIRO^{1,2}, Vasco AZEVEDO², Yves LE LOIR¹, Daniela PONTES², Sergio C. OLIVEIRA², Yakhya DIEYE¹, Jean-Christophe PIARD¹, Alexandra GRUSS¹, Philippe LANGELLA^{1*}

SUMMARY

Production and secretion of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: towards new live vaccines against brucellosis?

Brucella abortus is a facultative intracellular Gram negative bacterial pathogen that infects humans and animals by entry through the digestive tract. The immunogenic *B. abortus* ribosomal protein L7/L12 is a promising candidate antigen for the development of live oral vaccines against brucellosis, using food-grade lactic acid bacteria (LAB) as carrier. L7/L12 was produced under cytoplasmic and secreted forms [fused with a lactococcal signal peptide (SP)] in *Lactococcus lactis*, the model LAB. To express the L7/L12 gene, two promoters were used: i) the lactococcal constitutive promoter (P_{59}) and ii) the nisin-inducible promoter (P_{nisA}). Both P_{59} and P_{nisA} led to an equivalent rate of production of both cytoplasmic (~ 0.5 mg/L) and secreted L7/L12 (~ 3 mg/L). The highest secretion efficiency (proportion of the secreted L7/L12) was 77% obtained with P_{59} compared to 35% observed with P_{nisA} . With both promoters, a 6-fold increase of the level of L7/L12 production was observed after fusion with the SP suggesting a strong intracellular proteolysis of L7/L12. These lactococcal strains constitute a promising alternative vaccinal strategy against brucellosis.

Key-words: *Lactococcus lactis*, *Brucella abortus*, L7/L12, secretion, inducible and constitutive promoters.

RÉSUMÉ

Brucella abortus est une bactérie pathogène à Gram négatif qui infecte le tube digestif de l'homme et des animaux. Nous développons des souches vaccinales de *Lactococcus lactis* contre la brucellose. L'antigène choisi est la protéine ribosomique L7/L12 de *B. abortus*. Nous avons produit L7/L12 sous

1 Laboratoire de génétique appliquée, Unité de recherches laitières et de génétique appliquée, Institut national de la recherche agronomique, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France.

2 Institut de sciences biologiques, Université fédérale du Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte - MG, Brésil.

* Correspondance
langella@jouy.inra.fr.

forme cytoplasmique et sous forme sécrétée (après fusion avec un peptide signal). Chacune des formes a été exprimée sous la dépendance d'un promoteur constitutif (P_{59}) et d'un promoteur inductible à la nisine (P_{nisA}). L'utilisation de ces deux promoteurs conduit à des niveaux de production de L7/L12 équivalents : environ 0,5 mg/L pour la forme cytoplasmique et 3 mg/L pour la forme sécrétée. Dans les deux cas, on note une augmentation d'un facteur 6 du niveau de production de la forme sécrétée suggérant une protéolyse intracellulaire importante de L7/L12. Ces souches de lactocoques productrices de L7/L12, en cours d'essai chez la souris, constituent de nouvelles alternatives vaccinales contre la brucellose.

Mots clés : *Lactococcus lactis*, *Brucella abortus*, L7/L12, sécrétion, promoteurs constitutifs et inductibles.

1 - INTRODUCTION

La brucellose, qui cause avortements et infertilités chez le bétail, demeure une zoonose majeure dans le monde. Elle provoque aussi des fièvres ondulantes, des endocardites, des arthrites et des ostéomyélites chez l'homme (BOSCHIROLI *et al.*, 2001). *Brucella abortus*, bactérie à Gram négatif intracellulaire facultative, est l'agent causal de la brucellose. La vaccination contre la brucellose chez le bétail et les ongulés sauvages repose sur des souches de *B. abortus* atténuées vivantes telles que les souches 19 (CORNER et ALTON, 1981) et RB51 (CHEVILLE, 2000). Bien que conférant une immunité protectrice, la souche 19 demeure pathogène chez l'homme et provoque des avortements chez les vaches en gestation. La souche RB51 est le vaccin le plus utilisé aux États-Unis mais elle est aussi dérivée d'une souche pathogène et ne peut être utilisée chez des vaches gestantes (CHEVILLE, 2000 ; KREEGER *et al.*, 2000 ; VAN METRE *et al.*, 1999).

Des stratégies vaccinales alternatives utilisant des antigènes de *B. abortus* ont été récemment explorées (OLIVEIRA et SPLITTER, 1996 ; BALOGLU *et al.*, 2000 ; RIBEIRO *et al.*, 2001). La protéine ribosomique L7/L12 de *B. abortus* est capable d'induire une réponse immune cellulaire et confère une immunité protectrice chez la souris (OLIVEIRA et SPLITTER, 1996).

L'utilisation de bactéries lactiques (BL), bactéries alimentaires noninvasives et totalement inoffensives comme vecteur d'antigènes constitue une stratégie vaccinale prometteuse pour des vaccinations peu onéreuses et à grande échelle. De nombreux antigènes bactériens et viraux ont déjà été produits chez la BL modèle, *Lactococcus lactis* (GILBERT *et al.*, 2000 ; LANGELLA et LE LOIR, 1999) et, dans certains cas, l'immunogénicité a été démontrée (ENOUF *et al.*, 2001 ; ROBINSON *et al.*, 1997). Comme *L. lactis* est une bactérie noncommensale qui transite, la stratégie choisie est de produire *in vitro* une quantité élevée d'antigènes avant l'administration orale ou intranasale à des souris (CHAMBERLAIN *et al.*, 1997).

Dans ce travail, nous avons comparé les niveaux de production sous le contrôle du promoteur constitutif P_{59} (VAN DER VOSSSEN *et al.*, 1987) et du promoteur inductible P_{nisA} (DE RUYTER *et al.*, 1996) de la protéine antigénique

L7/L12 de *Brucella abortus* chez *L. lactis*. Quatre vecteurs d'expression ont été utilisés pour cibler L7/L12 dans le cytoplasme de la bactérie et dans le milieu extracellulaire afin de définir la localisation la plus immunogène.

2 – MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Souches bactériennes, conditions de croissance et manipulations d'ADN

Les souches *L. lactis* MG1363 et *L. lactis* NZ9000 (KUIPERS *et al.*, 1998) sont cultivées à 30 °C sur milieu M17 (DIFCO) additionné de 1 % de glucosé. *Escherichia coli* TG1 (GIBSON, 1984) est cultivé sous agitation à 37 °C sur milieu Luria-Bertani (DIFCO). Toutes les constructions plasmidiques ont d'abord été obtenues chez *E. coli* puis transférées chez *L. lactis*. Les électrotransformations sont effectuées comme précédemment décrit (LANGELLA *et al.*, 1993). Les clones porteurs des plasmides désirés ont été sélectionnés par utilisation d'antibiotiques aux concentrations suivantes (en microgrammes par millilitre) : pour *L. lactis*, érythromycine (5) ou chloramphénicol (10) ; et pour *E. coli*, ampicilline (100) ou chloramphénicol (10) et quand l'érythromycine et l'ampicilline étaient utilisés ensemble, les concentrations étaient 75 µg/mL pour chaque antibiotique. Les manipulations d'ADN étaient effectuées comme décrites précédemment (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.2 Constructions des vecteurs d'expression de L7/L12

Les plasmides utilisés et les différentes cassettes d'expression de L7/L12 sont respectivement décrits dans le *tableau 1* et sur la *figure 1*. Les plasmides pCYT : L7/L12 et pSEC : L7/L12 permettent respectivement les productions cytoplasmiques et sécrétées sous la dépendance de P_{nisA} chez *L. lactis*-NZ9000 (RIBEIRO *et al.*, 2001). Afin de construire des plasmides permettant les productions cytoplasmiques et sécrétées sous la dépendance de P_{59} , L7/L12 a été inséré dans les plasmides pVE5529 and pVE5523 (DIEYE *et al.*, 2001), respectivement, à l'aide des oligonucléotides suivants : en 5' GGGTCGACGCT-GATCTCGCAAAG' (*Sall*) et en 3' GGGATATCTTACTTGAGTTCAAC (*EcoRV*). Ces vecteurs ont été digérés par *Sall* et *EcoRV* et ligaturés avec un fragment PCR digéré par *Sall*-*EcoRV* résultant dans les plasmides pCYT₅₉ : L7/L12 et pSEC₅₉ : L7/L12 respectivement (*figure 1*). Toutes ces constructions plasmidiques ont été introduites chez *L. lactis* MG1363.

2.3 Induction à la nisine

Les inductions de P_{nisA} pour l'expression de L7/L12 ont été effectuées de la façon suivante : des cultures d'une nuit de souches dérivées de *L. lactis* NZ9000 sont utilisées pour inoculer du milieu stérile au 1:50. Après 3 h d'incubation (correspondant à une DO_{600} d'environ 0,4), de la nisine A (SIGMA) est additionnée aux cultures à une concentration finale de 1 ng/mL. La croissance des souches était continuée pendant une heure avant de procéder aux extractions de protéines.

Tableau 1
Plasmides utilisés dans ce travail

Table 1
Plasmids used in this study

Plasmides	Caractéristiques	Référence
pMal:L7/L12	Ap ^r ; pMal-c2 contenant le gène <i>L7/L12</i>	OLIVEIRA et SPLITTER, 1996
pVE3655	pGK, Cm ^r ; vecteur d'expression contenant le promoteur inducible P _{<i>nisA</i>}	ENOUF <i>et al.</i> , 2001
pCYT:Nuc	pGK, Cm ^r ; partie mature de Nuc sous le contrôle de P _{<i>nisA</i>}	ENOUF <i>et al.</i> , 2001
pSEC:Nuc	pGK, Cm ^r ; partie mature de Nuc fusionnée au peptide signal du gène <i>usp45</i> (PS _{<i>Usp</i>}) sous le contrôle de P _{<i>nisA</i>}	ENOUF <i>et al.</i> , 2001
pVE5529	pIL252, Ery ^r ; partie mature de Nuc exprimée sous le contrôle du promoteur P _{<i>59</i>}	DIEYE <i>et al.</i> , 2001
pVE5523	pIL252, Ery ^r ; partie mature de Nuc fusionnée au peptide signal du gène <i>usp45</i> (PS _{<i>Usp</i>}) sous le contrôle de P _{<i>59</i>}	DIEYE <i>et al.</i> , 2001
pCYT:L7/L12	pGK : Cm ^r ; pCYT:Nuc où le gène <i>nuc</i> a été remplacé par le gène <i>L7/L12</i>	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2001
pSEC:L7/L12	pGK : Cm ^r ; pSEC:Nuc où le gène <i>nuc</i> a été remplacé par le gène <i>L7/L12</i>	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2001
pCYT _{<i>59</i>} :L7/L12	pIL252, Em ^r ; pVE5529 où le gène <i>nuc</i> a été remplacé par le gène <i>L7/L12</i>	Ce travail
pSEC _{<i>59</i>} :L7/L12	pIL252, Em ^r ; pVE5523 où le gène <i>nuc</i> a été remplacé par le gène <i>L7/L12</i>	Ce travail

a : Unité de recherches laitières et génétique appliquée, Institut national de la recherche agronomique, Jouy-en-Josas, France.

2.4 Extraction de protéines et immunodétection

Les extraits protéiques fractionnés étaient préparés à partir de cultures en phase exponentielle comme précédemment décrit (LE LOIR *et al.*, 1998). Ces extraits étaient ensuite analysés par électrophorèse sur gels de SDS polyacrylamide puis immunorévélés avec des anticorps anti-L7/L12 comme précédemment décrits (RIBEIRO *et al.*, 2001). La quantification s'effectue en comparant l'intensité des bandes obtenues avec ceux obtenus avec des quantités connues de la protéine antigénique L7/L12 purifiée.

3 – RÉSULTATS

Deux formes de L7/L12 ont été produites chez *L. lactis* :

- une forme cytoplasmique ;
- une forme sécrétée par fusion avec le peptide signal d'Usp45, la protéine sécrétée majoritaire des lactocoques (VAN ASSELDONK *et al.*, 1993).

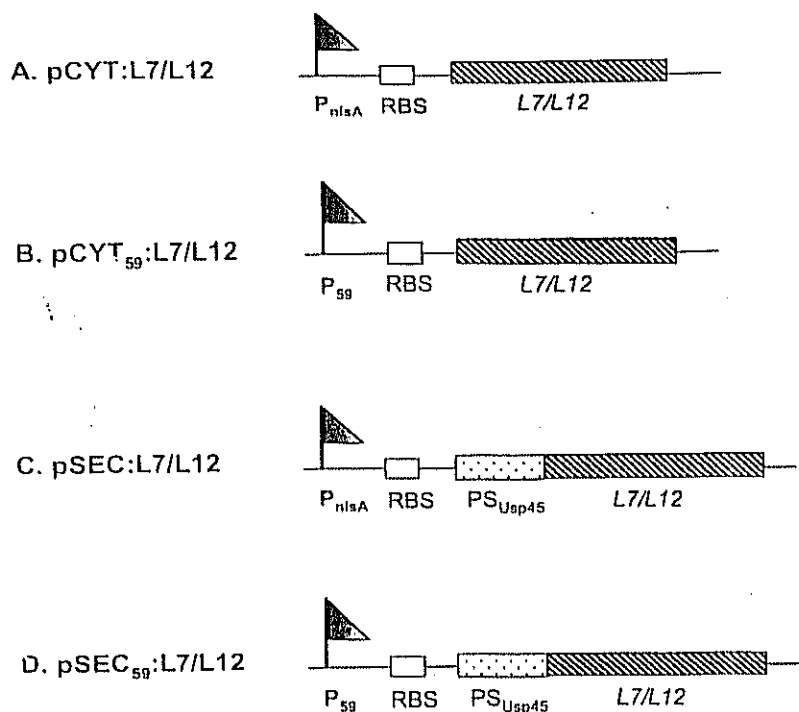


Figure 1

Cassettes d'expression pour la production et la sécrétion de L7/L12 chez *Lactococcus lactis*

Les supports génétiques des protéines de fusion portés par les différents plasmides sont représentés (voir la section Matériels et Méthodes et le tableau 1 pour les détails de construction de plasmides). P_{nisA} : promoteur inducible à la nisine ; P₅₉ : promoteur constitutif ; RBS : « Ribosomal Binding Site » du gène *usp45* ; PS_{Usp} : peptide signal d'Usp45 ; L7/L12 : fragment d'ADN spécifiant la protéine L7/L12 mature.

Expression cassettes for L7/L12 production and secretion in *Lactococcus lactis*

Schematic structures of the fusion proteins carried by the indicated plasmids. For details of plasmids construction, see Materials and Methods and table 1. P_{nisA}: nisin-inducible promoter; P₅₉: lactococcal constitutive promoter; RBS: Ribosomal Binding Site of *usp45* gene; SP_{Usp}: lactococcal signal peptide of Usp45; L7/L12: DNA fragment encoding the mature L7/L12 protein (not to scale).

Ces deux formes devraient nous permettre d'évaluer les niveaux de production de L7/L12 en fonction de sa localisation. Lors des essais d'immunisation par voie orale, nous pourrions aussi définir la localisation la plus immunogène : L7/L12 sera soit directement sécrétée, soit libérée après lyse de la souche porteuse dans la partie supérieure du tube digestif (estomac et duodénum) (DROUVAULT *et al.*, 1999). Pour chacune des formes, nous avons utilisé P₅₉ et P_{nisA}.

3.1 Production cytoplasmique de la protéine L7/L12 chez *L. lactis*

Nous avons d'abord analysé par immunodétection le contenu protéique total de deux souches de *L. lactis* : NZ9000 (pCYT:L7/L12) et MG1363 (pCYT₅₉:L7/L12) (figure 2). En absence de nisine, aucune bande protéique spécifique de L7/L12 n'est détectée dans la souche NZ9000 (pCYT:L7/L12) (résultats non présentés). Dans les cultures induites, une fine bande de PM apparent d'environ 28 kDa est visualisée dans l'extrait total (figure 2, puits 2). Cette

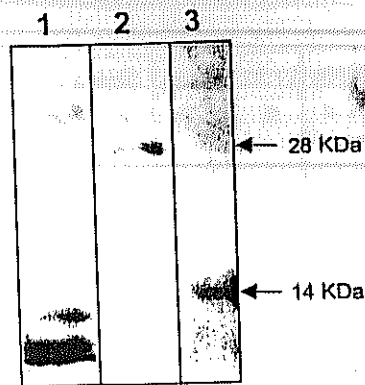


Figure 2

Production intracellulaire de la protéine L7/L12 chez *Lactococcus lactis*

La production de L7/L12 a été estimée par immunodétection avec des anticorps anti-L7/L12 sur des extraits protéiques totaux préparés à partir de cultures en phase exponentielle de souches de lactocoques contenant pCYT:L7/L12 (forme cytoplasmique sous contrôle de P_{nlsA} ; puit 2) ; pCYT₅₉:L7/L12 (forme cytoplasmique sous contrôle de P_{59} ; puit 3). Dans le cas de P_{nlsA} , les cultures sont induites par la nisine pendant une heure. La protéine L7/L12 purifiée et quantifiée est utilisée comme standard (puit 1).

Intracellular production of L7/L12 protein in *Lactococcus lactis*

L7/L12 production was estimated by Western blot analysis of lactococcal strains containing pCYT:L7/L12 (cytoplasmic form under the control of P_{nlsA} ; well 2) and pCYT₅₉:L7/L12 (cytoplasmic form under the control of P_{59} ; well 3), using anti-L7/L12 antibodies. Total protein extractions were prepared on exponential growth phase of these cultures. In the case of P_{nlsA} , the cultures were induced with nisin during one hour. Purified L7/L12 protein was loaded as standard (well 1).

bande, d'un poids moléculaire (PM) deux fois plus élevé que le PM attendu (14 kDa), pourrait correspondre à un dimère de L7/L12 résistant à la dénaturation au SDS. Dans la souche MG1363 (pCYT₅₉:L7/L12) (figure 2, puits 3), nous observons une bande correspondant au PM attendu. Les quantités détectées de L7/L12 en expression constitutive ou inducible sont évaluées à environ 0,5 mg/L. Cette production est environ 10 fois plus faible que celle obtenue avec des formes cytoplasmiques de Nuc (SHORTLE, 1983 ; LE LOIR et al., 1994), protéine sécrétée modèle (résultats non présentés).

3.2 Sécrétion de la protéine L7/L12 chez *L. lactis*

La production extracellulaire de L7/L12 a été obtenue par fusion avec le peptide signal d'Usp45, PS_{Usp} . Nous avons analysé les contenus protéiques des fractions cellulaires (C) et surnageants (S) des deux souches de *L. lactis* NZ9000 (pSEC:L7/L12) et MG1363 (pSEC₅₉:L7/L12) (figure 3). Deux bandes sont détectées dans les extraits des deux souches : une bande dans la fraction C correspondant au précurseur préUspL7/L12 (migrant à environ 17 et 21 kDa dans les cas respectifs de pSEC:L7/L12 et de pSEC₅₉:L7/L12) et une bande dans la fraction S qui migre à la taille attendue pour la forme mature de L7/L12 (~ 14 kDa). Il faut noter que dans le cas de MG1363 (pSEC₅₉:L7/L12), le PM attendu et observé de 21 kDa est dû au fait que les 11 premiers acides aminés de la partie mature d'Usp45 ont été conservés (DIEYE et al., 2001). La production totale de L7/L12 est de 3 mg/L avec P_{nlsA} (après une heure d'induction) et avec P_{59} (après 4 heures de croissance). L'efficacité de sécrétion (ES, pourcen-

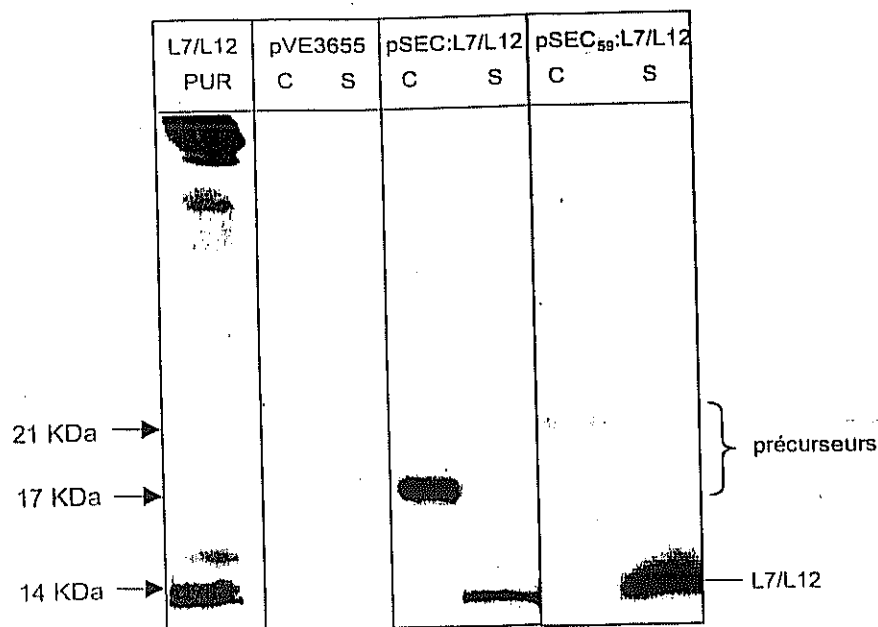


Figure 3

Sécrétion de L7/L12 chez *Lactococcus lactis*

La sécrétion de L7/L12 est estimée par immunodétection avec des anticorps anti-L7/L12 sur des extraits protéiques préparés à partir de cultures en phase exponentielle de croissance contenant pVE3655 (contrôle négatif), pSEC:L7/L12 (sous contrôle de P_{nisA}) et pSEC₅₉:L7/L12 (sous contrôle de P_{59}). Les extraits protéiques sont séparés en fraction cellulaire (C) et surnageant (S). Dans le cas de P_{nisA} , les cultures sont induites par la nisine pendant une heure. Les flèches indiquent les positions de migration du précurseur (préL7/L12) et de la forme mature (L7/L12). La protéine L7/L12 purifiée et quantifiée est utilisée comme standard.

Secretion of L7/L12 protein in *Lactococcus lactis*

L7/L12 secretion was estimated by Western blot analysis on exponential growth phase of lactococcal strains containing pVE3655 (negative control), pSEC:L7/L12 (under the control of P_{nisA}) and pSEC₅₉:L7/L12 (under the control of P_{59}). Protein extractions were prepared on cellular (C) and supernatant (S) fractions of these cultures. In the case of pSEC:L7/L12, the cultures were induced with nisin during one hour. After SDS-PAGE, immunodetection was performed with anti-L7/L12 antibodies. Arrows indicate migration positions of precursor form (preL7/L12) and mature form (L7/L12). Purified L7/L12 protein was loaded as standard.

tage de L7/L12 sécrétée détectée dans le surnageant) est de 35 % avec P_{nisA} et de 77 % avec P_{59} .

4 - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nous avons donc produit et sécrété l'antigène L7/L12 de *B. abortus* sous la dépendance de P_{59} et comparé ces résultats avec ceux récemment obtenus chez *L. lactis* sous la dépendance de P_{nisA} (RIBEIRO et al., 2001).

Ces résultats démontrent qu'il est possible de faire sécréter efficacement chez *L. lactis* une protéine cytoplasmique d'une bactérie à Gram négatif. Outre

cet aspect, on peut également souligner que la fusion de L7/L12 avec le PS_{Usp} conduit à une augmentation significative de la production totale de L7/L12. De tels résultats avaient déjà été observés avec trois autres protéines hétérologues chez *L. lactis* : la protéine non-structurale NSP4 du rotavirus bovin (ENOUF *et al.*, 2001), l'oncoprotéine E7 du Papillomavirus humain (BERMUDEZ-HUMARAN *et al.*, 2001), et la β -lactoglobuline bovine (CHATEL *et al.*, 2001). Nous supposons que cette augmentation est liée au fait que la translocation de préUspL7/L12 lui permet d'échapper à la protéolyse intracellulaire.

Le ciblage d'un antigène bactérien, le fragment C de la toxine tétanique (TTFC), dans le cytoplasme, la paroi et le milieu extérieur a déjà été décrit chez *L. lactis* (NORTON *et al.*, 1997). Ces souches productrices de TTFC avaient induit chez la souris une réponse immune protectrice, suggérant que *L. lactis* constituait un bon vecteur pour délivrer des antigènes et induire une immunité muco-sale (NORTON *et al.*, 1997). Récemment, il a été démontré que la sécrétion de l'Interleukine-10 par *L. lactis* pouvait constituer une nouvelle stratégie de traitement des inflammations chroniques du tube digestif (STEIDLER *et al.*, 2000).

Les souches de *L. lactis* décrites ici vont permettre de mesurer une éventuelle réponse immune muco-sale et systémique chez la souris et de définir la localisation la plus immunogène de L7/L12. Si nous obtenons une réponse immune spécifique de L7/L12, des défis avec des souches virulentes de *B. abortus* seront menés chez des souris vaccinées. Ces souches pourraient ainsi constituer de nouvelles stratégies vaccinales anti-brucellose préférables aux vaccins actuels.

REMERCIEMENTS

Nous remercions J. COMMISSAIRE, J. EYRE, J.-J. GRATADOUX, S. NOUAILLE, et A. MIYOSHI pour les discussions scientifiques et leur soutien amical. Cette recherche est financée par le ministère de l'Éducation nationale, de la Recherche et de la Technologie (MENRT, France) et par la CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BALOGLU S., TOTH T.E., SCHURIG G.G., SRIRANGANATHAN N., BOYLE S.M., 2000. Humoral immune response of BALB/C mice to a vaccinia virus recombinant expressing *Brucella abortus* GroEL does not correlate with protection against a *B. abortus* challenge. *Vet. Microbiol.*, 76, 193-199.
- BERMUDEZ-HUMARAN L.G., LANGELLA P., GRUSS A., MONTES DE OCA-LUNA R., LE LOIR Y., 2001. Production of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis*. Sous presse dans *Applied Environ. Microbiol.*
- BOSCHIROLI M.-L., FOULONGNE V., CALLAGHAN D.O., 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4, 58-64.
- CHAMBERLAIN L., WELLS J.M., ROBINSON R., SCHOFIELD K., LE PAGE R., 1997. Muco-

- sal immunization with recombinant *Lactococcus lactis*. In: POZZI G., WELLS J.M. (ed.), *Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization*, 83-106, Springer-Verlag and Landes Bioscience, Austin, Tex.
- CHATEL J.-M., LANGELLA P., ADEL-PATIENT K., COMMISSAIRE J., WAL J.M., CORTIER G., 2001. Induction of local immune response after intranasal and oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin, a major cow's milk allergen. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 545-551.
- CHEVILLE N.F., 2000. Development, testing and commercialization of a new brucellosis vaccine for cattle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **916**, 147-153.
- CORNER L.A., ALTON G.G., 1981. Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Res. Vet. Sci.*, **31**, 342-344.
- 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.
- DIEYE Y., USAI S., CLIER F., PIARD J.C., 2001. Design of a protein targeting system for lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, **183**, 4157-4166.
- DROUAULT S., CORTIER G., EHRLICH S.D., RENAULT P., 1999. Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4881-4886.
- ENOUF V., LANGELLA P., COMMISSAIRE J., COHEN J., CORTIER G., 2001. Bovine rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1423-1428.
- GIBSON T.J., 1984. PhD thesis. University of Cambridge, Cambridge, England.
- GILBERT C., ROBINSON K., LE PAGE R.W., WELLS J.M., 2000. Heterologous expression of an immunogenic pneumococcal type 3 capsular polysaccharide in *Lactococcus lactis*. *Infect. Immun.*, **68**, 3251-3260.
- KREEGER T.J., MILLER M.W., WILD M.A., ELZER P.H., OLSEN S.C., 2000. Safety and efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in captive pregnant elk. *J. Wildl. Dis.*, **36**, 477-483.
- KUIPERS O.P., DE RUYTER P.G., KLEERBEZEM M., DE VOS W.M., 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.*, **64**, 15-21.
- LANGELLA P., LE LOIR Y., 1999. Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **32**, 191-198.
- LANGELLA P., LE LOIR Y., EHRLICH S.D., GRUSS A., 1993. Efficient plasmid mobilization by pIP501 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Bacteriol.*, **175**, 5806-5813.
- LE LOIR Y., GRUSS A., EHRLICH S.D., 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., LANGELLA P., 1998. A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **180**, 1895-1903.
- NORTON P.M., WELLS J.M., BROWN H.W., MACPHERSON A.M., LE PAGE R.W., 1997. Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine*, **15**, 616-619.
- OLIVEIRA S.C., SPLITTER G.A., 1996. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine*, **14**, 959-962.
- RIBEIRO L.A., AZEVEDO V., LE LOIR Y., OLIVEIRA S.C., DIEYE Y., PIARD J.C., GRUSS A., LANGELLA P., 2002. Production and targeting of the *Brucella abortus* immunodominant antigen L7/L12 by *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 910-916.
- ROBINSON K., CHAMBERLAIN E.M., SCHOFIELD K.M., WELLS J.M., LE PAGE R.W., 1997. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat. Biotechnol.*, **15**, 653-657.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SHORTLE D., 1983. A genetic system analysis of staphylococcal nuclease. *Gene*, **22**, 181-189.
- STEIDLER L., HANS W., SCHOTTE L., NEIRYNCK S., OBERMEIER F., FALK W., FIERS W., REMAUT E., 2000. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, **289**, 1352-1355.

VAN ASSELDONK M., DE VOS W.M., SIMONS G., 1993. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* usp45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous alpha-amylase. *Mol. Gen. Genet.*, 240, 428-434.

VAN DER VOSSSEN J.M.B.M., VAN DER LELIE D., VENEMA G., 1987. Isolation and

characterization of *Streptococcus cremoris* Wg-2 specific promoters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2452-2457.

VAN METRE D.C., KENNEDY G.A., OLSEN S.C., HANSEN G.R., EWALT D.R., 1999. Brucellosis induced by RB51 vaccine in a pregnant heifer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 215, 1491-1493.

Tous les livres professionnels du monde entier !

www.Lavoisier.fr

• Plus de 700 000 ouvrages référencés dans tous les domaines

• Expédition en 24 h de 25 000 titres en stock

• Le Doc : service personnalisé et gratuit

www.Lavoisier.fr, la librairie professionnelle de référence.

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](#)