



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VACINAS RECOMBINANTES CONTRA ERISPELA SUÍNA:
DESENVOLVIMENTO INTEGRADO DE BIOPROCESSO, DA
BIOLOGIA MOLECULAR AO BIORREATOR

ADILSON JOSÉ DA SILVA

SÃO CARLOS – SP
OUTUBRO DE 2011

ADILSON JOSÉ DA SILVA

Vacinas recombinantes contra erisipela suína: desenvolvimento integrado de bioprocesso, da biologia molecular ao biorreator

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Orientadores:
Roberto de Campos Giordano
Maria Teresa Marques Novo

São Carlos
Outubro de 2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S586vr

Silva, Adilson José da.

Vacinas recombinantes contra erisipela suína :
desenvolvimento integrado de bioprocesso, da biologia
molecular ao biorreator / Adilson José da Silva. -- São
Carlos : UFSCar, 2011.

170 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2011.

1. Biotecnologia. 2. Erysipelothrix rhusiopathiae. 3.
Salmonella typhimurium. 4. Engenharia bioquímica. 5.
Imunologia. 6. Proteínas recombinantes. I. Título.

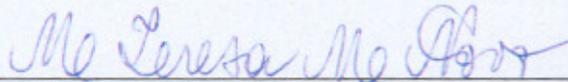
CDD: 660.6 (20^a)

Adilson José da Silva

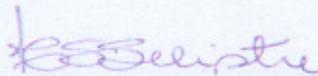
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 11/10/2011

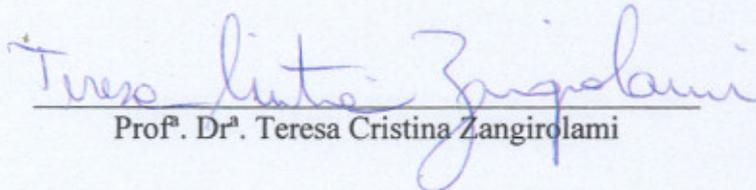
BANCA EXAMINADORA



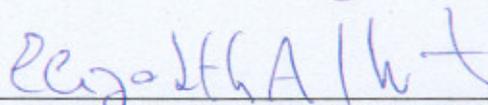
Profª. Drª. Maria Teresa Marques Novo



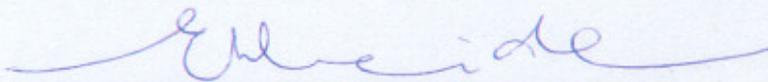
Profª. Drª. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo



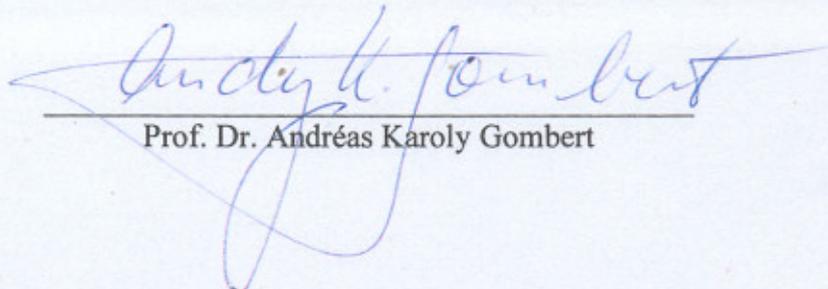
Profª. Drª. Teresa Cristina Zangirolami



Drª. Elizabeth Angélica Leme Martins



Drª. Maria Elisabete Sbrogio -Almeida



Prof. Dr. Andréas Karoly Gombert

*À minha família, pelo amor, apoio e
generosidade.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças à ajuda de muitas pessoas ao longo destes quatro anos. Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente para que eu pudesse finalizar essa etapa tão importante na minha vida.

Aos meus orientadores Teresa, Maria Teresa e Roberto, dedico um agradecimento especial. Levo para minha vida e para minha carreira o exemplo e os ensinamentos de cada um de vocês. Agradeço pela confiança, amizade, paciência e dedicação, que sempre me motivaram para realizar este trabalho. Juntos formamos um belo time! Agradeço à Dra. Elisabete Sbrogio, pela orientação e ajuda fundamental nos experimentos de imunização. Muito obrigado pelo grande exemplo de generosidade!

*Sou grato também à Dra. Elizabeth Martins por me receber em seu Laboratório no Instituto Butantan e pela utilização da linhagem de *S. typhimurium* SL4213, e à Dra. Erika Nakajima pela ajuda e ensinamentos no trabalho com as linhagens de *Salmonella*. Também agradeço à Mickie e Viviane do Instituto Butantan.*

*Agradeço ainda, ao Prof. Flávio pela linhagem de *E. coli* DH5 α , e a seus alunos e ex-alunos Márcia, Kesser, Wilson e Andrea por toda ajuda. Um agradecimento especial ao Fernando pelos seqüenciamentos de DNA. Sou grato também à Profa. Dulce pela linhagem de *E. coli* XL1-blue e por toda ajuda. Obrigado à Profa Heloísa pela utilização dos equipamentos do seu laboratório e ajuda na obtenção dos anticorpos anti-rSpaA. Muito obrigado à Profa. Raquel pela utilização dos equipamentos e materiais do Laboratório de Biologia Molecular, fundamental para este trabalho. Agradeço também à disponibilidade em ajudar da Profa Fernanda.*

Agradeço aos técnicos do laboratório de Engenharia Bioquímica, em especial a Amadeus Azevedo pelas análises de HPLC. Ao Roberto e Rivair do Biotério da UFSCar, pela colaboração e suporte. Ao Calixto, meu muito obrigado pela ajuda na inoculação dos animais.

*Sou muito grato ao Dr. Ivaylo Gentshev da Universidade de Würzburg, Alemanha, pela doação do plasmídeo pMOhly1 e da *Salmonella typhimurium* SL7207. Sem a sua generosidade este trabalho não seria possível.*

*Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, ao Departamento de Engenharia Química e todos os funcionários. Registro também meus agradecimentos à FAPESP pela bolsa de doutorado, e a CAPES e CNPq pelo financiamento do trabalho. À Vallée S.A. pelas linhagens de *E. rhusiopathiae*, e à Maria do Carmo pelas consultas e toda ajuda neste trabalho.*

Agradeço a todos os amigos com quem partilhei tantos momentos especiais nestes anos em São Carlos. Um agradecimento especial àqueles que viraram noites comigo no laboratório durante os cultivos em biorreator: kk, Cíntia, Carlos, Inti, e Ana Maria. Obrigado! Agradeço também à Mônica, que me ensinou com tanta dedicação e bom humor a trabalhar com Biologia Molecular. Sua ajuda foi fundamental, muito obrigado! Aos meus amigos da Graduação que ainda fazem parte da minha vida em São Carlos: Diogo, Zé, Renata, Ana e Jana. Agradeço pelo companheirismo e apoio nestes dez anos de amizade! Aos amigos do vôlei, Cibele, Ivana, Rodrigo, Danilo, Nestor, Estéban, Aline e aos outros que passaram por lá, por me ajudarem a descontrair e pelas reuniões aos finais de semana. Obrigado também aos que já partiram de São Carlos: Dasci, Adriano, Edson e todos os demais. Aos novos amigos, Claudinha, Mirela, Chanel e Sandrinha pelos momentos memoráveis neste último ano de doutorado! Agradeço também aos demais amigos do Departamento de Engenharia Química e do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar.

Por fim, agradeço aos meus pais, José Braz e Maria Ivone, e aos meus irmãos, Fábio e Rose, e demais familiares, por todo amor, suporte e incentivo.

A Deus, pela graça da vida.

There does not exist a category of science to which one can give the name applied science. There are sciences and the applications of science, bound together as the fruit of the tree which bears it.

Louis Pasteur, 1871

RESUMO

A erisipela suína é uma das enfermidades que causam grandes prejuízos na suinocultura em todo o mundo. A doença é causada pela bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae*, e a proteína de superfície SpaA desse microrganismo é um de seus principais antígenos. Neste trabalho, estudou-se o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a erisipela suína a partir do antígeno SpaA. Avaliou-se a produção de uma vacina de subunidade composta pelo antígeno recombinante, a qual foi estudada em frascos agitados e em biorreatores de bancada de 5,0 L. Para isso, um fragmento de 1026 pb do gene *spaA* foi clonado em células de *Escherichia coli* sob controle do promotor *lac* e o organismo recombinante (*E. coli* BL21(DE3) pET28a_ *spaA*) foi cultivado em batelada alimentada, utilizando-se meio complexo contendo glicerol como fonte de carbono. Estratégias não convencionais de indução foram avaliadas e altos valores de rendimento (158 mg_{prot}/g_{DCW}) e produtividade (0,4 g_{prot}/L.h) da proteína recombinante foram alcançados. O mesmo antígeno foi clonado em um plasmídeo que possibilita a expressão e secreção da proteína recombinante em *Salmonella typhimurium* atenuada, a fim de se obter um vetor bacteriano vivo para o antígeno em questão. A linhagem recombinante foi capaz de expressar e secretar o fragmento da proteína SpaA fusionado ao sinal de secreção da alfa-hemolisina tanto *in vitro* quanto *in vivo*, apresentando alta taxa de manutenção plasmidial nas duas condições. Além disso, o veículo vacinal se mostrou capaz de colonizar as placas de Peyer e de invadir a barreira epitelial do intestino dos animais inoculados. Ensaio de imunização em modelo murino mostraram que a veiculação do antígeno pelas células de *Salmonella* inoculadas por via oral induziu a produção de anticorpos IgG séricos anti-SpaA, que de acordo com a literatura, devem ser capazes de promover a opsonização do patógeno em caso de infecção, contribuindo para conferir uma imunidade protetora contra a erisipela suína aos animais vacinados. Em suma, este trabalho apresenta contribuições para o desenvolvimento de vacinas de subunidade contra a erisipela suína na forma de uma vacina de proteína recombinante, ou por veiculação do antígeno SpaA por linhagens atenuadas de *S. typhimurium*.

Palavras-chave: Erisipela suína. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Vetor bacteriano vivo. *Salmonella typhimurium*. Vacina recombinante. Cultivo em biorreator.

ABSTRACT

Swine erysipelas is among the diseases that causes great economic losses in swine cultures worldwide. The disease is caused by the bacterium *Erysipelothrix rhusiopathiae*, and the surface protein SpaA is one of its main antigens. Herein, we report studies concerning the development of recombinant vaccines against swine erysipelas based on the SpaA antigen. Protein production for a subunit vaccine formulation was studied in shaken flasks and 5.0 L bioreactors. For this propose, a 1026 bp fragment of the *spaA* gene was cloned in *Escherichia coli* cells under the *lac* promoter control. The recombinant organism (*E. coli* BL21(DE3) pET28a_ *spaA*) was cultivated in fed batch using complex medium with glycerol as carbon source. Non-conventional induction strategies were evaluated and high protein yield (158 mg_{prot}/g_{DCW}) and productivity values (0.4 g_{prot}/L.h) were reached. The same antigen was cloned for expression and secretion in attenuated *Salmonella typhimurium* cells to obtain a live bacterial vector for the SpaA antigen. The recombinant lineage was able to express and secrete the SpaA fragment fused to the alpha-hemolysin secretion signal both *in vitro* and *in vivo*. High plasmid maintenance was observed in both conditions. The vaccinal vehicle showed to be able to colonize the Peyer patches and to invade the gut epithelial barrier in the inoculated animals. Immunization tests in murine model showed that the recombinant antigen delivered by *Salmonella* cells inoculated by oral route induced the production of seric IgG antibodies anti-SpaA. According to the literature, these antibodies must be able to promote pathogen opsonization in case of infection, contributing to confer a protective immunity against swine erysipelas to the vaccinated animals. In summary, this work presents contributions to development of subunit vaccines against swine erysipelas, in the form of recombinant protein formulations, or SpaA antigen delivery by attenuated *S. typhimurium* cells.

Keywords: Swine erysipelas. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Live bacterial vector. *Salmonella typhimurium*. Recombinant vaccine. Bioreactor cultivation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Esquema representativo da proteína SpaA de <i>E. rhusiopathiae</i> , seqüência do gene <i>spaA</i> e respectiva tradução.....	41
Figura 2.2 – Via biossintética de compostos aromáticos de <i>S. typhimurium</i>	54
Figura 2.2a – Representação esquemática do vetor pBR322 usado na construção do plasmídeo pANN202-812 (e conseqüentemente no pMOhly1).....	57
Figura 2.2b – Esquema da construção do vetor pMOhly1 e da clonagem de genes heterólogos neste vetor.....	57
Figura 3.1 – Seqüência do gene <i>spaA</i> de <i>E. rhusiopathiae</i> linhagem Fujisawa disponível na base de dados DDBJ/EMBL/GenBank sob número de acesso AB019124.....	139
Figura 3.2 – Esquema proposto para a criação de um sítio <i>NotI</i> no vetor pMOhly1 a ser utilizado na clonagem do fragmento <i>spaA</i>	141
Figura 3.3 – Seqüência do fragmento do gene da hemolisina (<i>hlyA</i>) presente no plasmídeo pMOhly1 e regiões de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores Fow Seq pMO1 e Rev Seq pMO1.....	146
Figura 3.4 – Amplificação por PCR do fragmento <i>spaA</i> com sítios de restrição <i>NotI</i> utilizando como molde o plasmídeo recombinante pGEM_ <i>spaA</i>	158
Figura 3.5 – PCR de colônia da transformação do pGEM-T com o inserto <i>spaA</i> (<i>NotI</i>).....	159
Figura 3.6 – Plasmídeos extraídos das colônias de <i>E. coli</i> resistentes a ampicilina após transformação com o produto da reação de ligação entre pMOhly1 + adaptadores + inserto.....	160
Figura 3.7 – Digestão das mini-preparações da transformação pMOhly1 + adaptadores + inserto com a enzima <i>NotI</i>	161
Figura 3.8 – Digestão das mini-preparações das colônias 1 e 4 com enzima de restrição <i>NotI</i>	161
Figura 3.9 – Digestão do plasmídeo extraído da colônia 1 e do plasmídeo pMOhly1 com a enzima de restrição <i>HindIII</i>	162
Figura 3.10 – PCR de colônia da transformação do pMOhly1 com o inserto <i>spaA</i> (<i>NotI</i>).....	163
Figura 3.11 – SDS-PAGE e <i>Western blot</i> das amostras do cultivo do clone <i>E. coli</i> XL1-blue pMOhly1_ <i>spaA</i>	164
Figura 3.12 – Amplificação por PCR do fragmento <i>spaA</i> a partir do DNA plasmidial das colônias de <i>S. typhimurium</i> SL4213 e SL7207 transformadas com a construção pMOhly1_ <i>spaA</i>	165

Figura 3.13 – Comparação do crescimento do clone SL7207 pMOhly1_ <i>spaA</i> sob diferentes condições de aeração.....	166
Figura 3.14 – Curvas de crescimento celular de <i>S. typhimurium</i> SL7207 pMOhly1_ <i>spaA</i> . (a) medidas de DO _{600 nm} . (b) estimativa de μ_{max}	167
Figura 3.15 – Curva de calibração entre contagem de UFC/mL e medidas de DO _{600nm}	168
Figura 3.16 – Análise das proteínas do sobrenadante do cultivo do clone <i>S. typhimurium</i> SL7207 pMOhly1_ <i>spaA</i> por SDS-PAGE e <i>Western blot</i> com anticorpos anti-rSpaA.	169
Figura 3.17 – Contagem de colônias recuperadas das placas de Peyer dos animais inoculados com o vetor vivo recombinante <i>S. typhimurium</i> SL7207 pMOhly1_ <i>spaA</i> ao longo do tempo.....	171
Figura 3.18 – Contagem de colônias recuperadas do baço dos animais inoculados com o vetor vivo recombinante <i>S. typhimurium</i> SL7207 pMOhly1_ <i>spaA</i> ao longo do tempo	172
Figura 3.19 – Acompanhamento da manutenção do plasmídeo recombinante das células de <i>S. typhimurium</i> SL7207 pMOhly1_ <i>spaA</i> recuperadas do baço e Placas de Peyer dos animais imunizados.....	173
Figura 3.20 – IgG sérico contra rSpaA medido por ELISA após imunização em 3 doses.....	174
Figura 3.21 – IgG1 e IgG2a séricas contra rSpaA após imunização em 3 doses ...	176

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Meio N-5052 modificado.....	148
Tabela 3.2 – Solução de metais 1000x, para composição do Meio N-5052.....	148
Tabela 3.3 – Concentração de metabólitos ao final dos cultivos de <i>S. typhimurium</i> SL7207 pMOnly1_ <i>spaA</i> sob diferentes condições de aeração	167

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 – Hospedeiros para a produção de proteínas recombinantes	46
Quadro 2.2 – Densidades celulares máximas atingidas em cultivos de <i>E. coli</i> por diferentes técnicas de cultivo	49
Quadro 2.3 – Genes alvo para criação de linhagens atenuadas de <i>Salmonella</i>	53
Quadro 3.1 – Adaptadores e oligonucleotídeos iniciadores desenhados para clonagem do fragmento <i>spaA</i> no vetor pMOhly1	141
Quadro 3.2 – Oligonucleotídeos iniciadores para o seqüenciamento do inserto clonado no vetor pMOhly1.....	146

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
2.1 <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	35
2.1.1 Patologias provocadas pelo microrganismo	36
2.1.2. Fatores de virulência	37
2.1.3. Principais antígenos	38
2.1.4 Estimulação da resposta imune e vacinas atualmente disponíveis	43
2.2 VACINAS DE SUBUNIDADE	44
2.2.1 Vacinas de proteínas recombinantes	45
2.3 CULTIVOS DE <i>E. coli</i> RECOMBINANTE EM ALTA DENSIDADE CELULAR ...	47
2.4 VACINAS DE VETORES BACTERIANOS VIVOS	50
2.4.1 <i>Salmonella</i> sp.: aspectos gerais e vetores vacinais	52
2.4.2 Sistema de secreção da alfa-hemolisina e construção do vetor de expressão e secreção pMOhly1	54
3 MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
PARTE 1 – Produção do antígeno recombinante SpaA em células de <i>E. coli</i> para obtenção de vacina de subunidade a partir da proteína recombinante purificada.....	60
Seção 3.1 – Artigo 1: Clonagem, expressão, purificação e produção em frascos agitados do antígeno recombinante rSpaA de <i>E. rhusiopathiae</i> em células de <i>E. coli</i>	61
Seção 3.2 – Artigo 2: Produção do antígeno recombinante rSpaA de <i>E. rhusiopathiae</i> em cultivos de <i>E. coli</i> de alta densidade celular em biorreator	76
Anexo 1 – Termo de transferência de material: Acordo de envio da proteína rSpaA purificada para a empresa espanhola de produtos veterinários Hipra S.A.....	102
PARTE 2 – Clonagem e caracterização do antígeno SpaA em vetor bacteriano vivo: emprego de linhagem recombinante atenuada de <i>Salmonella typhimurium</i> e vetor plasmidial pMOhly1 para veiculação e secreção <i>in vivo</i> do antígeno rSpaA de <i>E. rhusiopathiae</i>	107
Seção 3.3 – Artigo 3: Mini revisão sobre vetores bacterianos vivos.....	108
Seção 3.4 – Clonagem em <i>Salmonella typhimurium</i> e caracterização da linhagem vacinal	137
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	138

3.1.1	Microrganismos	138
3.1.2	Clonagem do fragmento <i>spaA</i> no vetor de expressão pMOhly1	138
3.1.2.1	<i>Estratégia de clonagem: desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) e adaptadores</i>	139
3.1.2.2	<i>Amplificação por PCR do fragmento de <i>spaA</i> com sítios de restrição NotI</i> .	142
3.1.2.3	<i>Clonagem do fragmento <i>spaA</i>_(NotI) no vetor de propagação pGEM-T</i>	142
3.1.2.4	<i>Clonagem do fragmento <i>spaA</i>_(NotI) no vetor de expressão pMOhly1</i>	143
3.1.2.4.1	<i>Preparação do inserto</i>	143
3.1.2.4.2	<i>Preparação do vetor pMOhly1</i>	144
3.1.2.4.3	<i>Reação de ligação, transformação e confirmação da presença do inserto nos recombinantes</i>	145
3.1.3	Ensaio de expressão e secreção da rSpaA em <i>E. coli</i> XL1-Blue	147
3.1.4	Imunodeteccção da proteína rSpaA após cultivo do clone <i>E. coli</i> XL1-blue pMOhly1_ <i>spaA</i>: frações extracelular e intracelular	149
3.1.4.1	<i>Obtenção de proteínas da fração extracelular</i>	149
3.1.4.2	<i>Obtenção de proteínas da fração intracelular</i>	149
3.1.4.3	<i>Análise dos extratos de proteínas intracelulares e extracelulares</i>	150
3.1.5	Transformação de <i>S. typhimurium</i> com o vetor recombinante pMOhly_ <i>spaA</i>	150
3.1.5.1	<i>Preparação de estoque de células eletrocompetentes de <i>S. typhimurium</i></i> ..	150
3.1.5.2	<i>Transformação por eletroporação e confirmação dos clones de <i>S. typhimurium</i> recombinante</i>	151
3.1.6	Caracterização <i>in vitro</i> da linhagem vacinal <i>S. typhimurium</i> SL7207 pMOhly1_ <i>spaA</i>	152
3.1.6.1	<i>Curvas de crescimento da linhagem vacinal</i>	152
3.1.6.2	<i>Avaliação da manutenção do plasmídeo recombinante</i>	152
3.1.6.3	<i>Preparação da amostra do sobrenadante do cultivo da linhagem vacinal para deteccção da proteína recombinante</i>	153
3.1.6.4	<i>Western blot</i>	153
3.1.7	Caracterização <i>in vivo</i> da linhagem vacinal <i>S. typhimurium</i> SL7207 pMOhly1_ <i>spaA</i>	154
3.1.7.1	<i>Capacidade de colonização e invasão</i>	154
3.1.7.2	<i>Avaliação da estabilidade do plasmídeo recombinante <i>in vivo</i></i>	154
3.1.7.3	<i>Experimentos de imunização e coleta de amostras de soro e fezes</i>	155

3.1.7.3.1 Análise da produção de anticorpos anti-rSpaA por ELISA	156
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	157
3.2.1 Clonagem do inserto <i>spaA</i> amplificado com sítios <i>NotI</i> no vetor pGEM-T	157
3.2.2 Clonagem do fragmento do gene <i>spaA</i> (<i>NotI</i>) no vetor de expressão pMOhly1	159
3.2.3 Expressão da rSpaA fusionada ao sinal de secreção da α-hemolisina pelas células de <i>E. coli</i> XL1-blue	163
3.2.4 Transformação das linhagens de <i>S. typhimurium</i> SL4213 e SL7207 com a construção pMOhly1_ <i>spaA</i>	164
3.2.5 Caracterização <i>in vitro</i> da linhagem vacinal <i>S. typhimurium</i> SL7207 pMOhly1_ <i>spaA</i>	165
3.2.6 Caracterização <i>in vivo</i> da linhagem vacinal <i>S. typhimurium</i> SL7207 pMOhly1_ <i>spaA</i>	170
3.2.6.1 Capacidade de colonização e invasão	170
3.2.6.2 Ensaio de imunização.....	173
4 CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO	177
5 REFERÊNCIAS.....	188

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade econômica em expansão, e dados da FAO indicam que o consumo da carne suína, que é a carne mais consumida no mundo, deve apresentar aumento anual médio de 2,0 % até 2015. O Brasil ocupa a 4ª colocação entre os maiores produtores mundiais, com um volume de produção de cerca de 3,2 milhões de toneladas em 2010 e previsão de 3,3 milhões de toneladas para 2011. À frente do Brasil estão China, União Européia e Estados Unidos com produção aproximada em 2010 de 52, 22 e 10 milhões de toneladas, respectivamente (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO).

Neste cenário, grandes investimentos têm sido feitos para aumentar a produtividade dos rebanhos, e o desenvolvimento de vacinas para as principais doenças que afetam os suínos está entre as prioridades.

A erisipela suína está globalmente distribuída e, juntamente com a pneumonia enzoótica e a desintéria suína, está entre as enfermidades que causam os maiores prejuízos na suinocultura mundial (MAKINO *et al.*, 1998). A doença é causada pela bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae* e apresenta quadros de artrite, endocardite e septicemia, entre outros sintomas, podendo levar os animais a óbito em sua forma aguda (WOOD, 1992).

Na atualidade, a erisipela suína é combatida pelo uso de vacinas com células de *E. rhusiopathiae* inativadas ou atenuadas, mas as formulações disponíveis não protegem os animais da forma crônica da doença e podem agravar os sintomas de artrite (WOOD, 1992). Por isso, tem-se buscado desenvolver novas vacinas para prevenção dessa enfermidade, que apresentem maior eficácia e sejam livres de efeitos colaterais.

De uma forma geral, a nova geração de vacinas deve fazer uso dos avanços no campo da biologia molecular tanto para a identificação de novos alvos antigênicos quanto para a criação de novas plataformas de produção e veiculação desses antígenos. A maior compreensão do funcionamento do sistema imunológico vem possibilitando também o direcionamento dos antígenos para promover mais seletivamente respostas imunes adequadas para a prevenção das doenças provocadas por cada classe de distintos patógenos, bem como a possibilidade de

explorar as propriedades imunoadjuvantes de citocinas e outras moléculas com ação relevante no estímulo à resposta imune.

Com tudo isso, novos sistemas de vacinação vêm sendo desenvolvidos e investigados nas últimas décadas no intuito tanto de aumentar a eficácia, segurança e facilidade de administração das vacinas em uso, como também de desenvolver novas vacinas para doenças cuja formação de uma imunidade prévia ainda não se faz possível pela inexistência de formulações eficientes para esse fim.

Essas novas tecnologias empregadas na produção de vacinas envolvem basicamente o desenvolvimento de vacinas de subunidade de natureza variada, como proteínas recombinantes ou moléculas de DNA, e a criação de vetores recombinantes vivos, bacterianos ou virais.

Para o caso da erisipela suína, alguns antígenos de seu agente etiológico já foram identificados e novas propostas vacinais para esta doença têm sido descritas na literatura. Para as novas formulações em desenvolvimento, a proteína SpaA de *E. rhusiopathiae* aparece como principal antígeno sob estudo. Experimentos realizados por diversos pesquisadores (MAKINO *et al.*, 1998; IMADA *et al.*, 1999; SHIMOJI *et al.*, 1999; KITAJIMA *et al.*, 2000; YOKOMIZO *et al.*, 2002; CHEUN *et al.*, 2004) em modelo murino e/ou em suínos mostraram que este antígeno é capaz de induzir a produção de anticorpos protetores nos animais vacinados, e estes apresentam alta taxa de sobrevivência quando desafiados com cepas virulentas do patógeno. A primeira parte deste trabalho aborda esta estratégia para a produção de uma vacina recombinante contra a erisipela suína. Partindo dos ótimos resultados de proteção relatados das formulações baseadas na proteína de superfície SpaA, foi realizada a clonagem em *E. coli* do fragmento contendo o(s) epítipo(s) protetor(es) desse antígeno, seguida de estudos de condições otimizadas para a viabilização da produção do fragmento recombinante com alta produtividade em cultivos de alta densidade celular.

A segunda parte do trabalho refere-se à construção de um vetor bacteriano vivo para a veiculação do antígeno SpaA. Uma linhagem atenuada da bactéria *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (chamada, a partir deste ponto, apenas de *Salmonella typhimurium*) foi escolhida como vetor por se tratar de um patógeno intracelular facultativo, como a bactéria *E. rhusiopathiae*, e também pela possibilidade de se desenvolver uma vacina de mucosa, que poderia estimular uma resposta imune no sítio de entrada do patógeno em questão. A via oral foi

empregada para inoculação da formulação, e o vetor vacinal recombinante foi construído para apresentar o antígeno de interesse na forma secretada.

De forma geral, *o objetivo deste trabalho foi contribuir para o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra erisipela suína, a partir do antígeno de superfície SpaA de E. rhusiopathiae. Na primeira etapa do trabalho, na qual foi realizado o desenvolvimento da vacina de subunidade antigênica, estabeleceram-se como objetivos específicos: i) clonagem no vetor pET para expressão heteróloga do fragmento de SpaA em E. coli; ii) estudar a influência das estratégias de cultivo e de indução da expressão na produção da proteína de interesse em cultivos de E. coli recombinante conduzidos com meio complexo. A segunda etapa do trabalho teve como objetivo específico a clonagem do gene spaA em uma linhagem de S. typhimurium atenuada, e posterior caracterização in vitro e in vivo do vetor vacinal expressando e secretando o antígeno de interesse.*

O trabalho apresentado nesta tese está, portanto, dividido como descrito a seguir. Primeiramente é apresentada uma revisão bibliográfica dos temas mais relevantes para o trabalho. A seguir são apresentados os materiais e métodos, e resultados e discussão, divididos em duas partes. A parte 1 é apresentada na forma de dois artigos científicos submetidos para publicação, que trazem os resultados da clonagem do antígeno SpaA em *E. coli* (Seção 3.1) e sua posterior produção em cultivos em batelada alimentada (Seção 3.2). A segunda parte do trabalho, trata do desenvolvimento do vetor bacteriano vivo para veiculação do antígeno SpaA. O assunto é introduzido por meio de uma mini-revisão (Seção 3.3) sobre vetores bacterianos vivos (em finalização para submissão), sendo seguido pela Seção 3.4 que apresenta os métodos e resultados da clonagem do gene *spaA* na linhagem vacinal de *S. typhimurium*, além de sua caracterização e avaliação da resposta imune induzida. Por fim seguem as conclusões, considerações finais e sugestões para a continuidade do trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O desenvolvimento de novas vacinas contra um agente microbiano infeccioso exige o uso de uma ampla gama de conhecimentos, abrangendo desde ciências básicas como microbiologia, biologia molecular, imunologia e vacinologia até os aspectos relacionados à produção da vacina em larga escala representados pela engenharia e síntese de bioprocessos. A revisão apresentada a seguir sintetiza as informações mais relevantes para o contexto do presente trabalho disponíveis na literatura.

2.1 *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Erysipelothrix rhusiopathiae é um bacilo Gram-positivo (embora possa parecer Gram-negativo porque descolore rapidamente no teste de Gram), anaeróbio facultativo, não formador de esporos, sem mobilidade e que é classificado no gênero *Erysipelothrix* juntamente com outras duas espécies, *E. tonsillarum* e *E. inopinata* (STACKEBRANDT e GENUS, 2009). A espécie *E. rhusiopathiae* é classificada em 23 sorotipos e o tipo N, de acordo com os antígenos peptidoglicanos da parede celular da bactéria (KUCSERA, 1973). Os suínos são suscetíveis a 15 sorotipos, sendo que o sorotipo 1 (subdividido em 1a e 1b) e o sorotipo 2 (subdividido em 2a e 2b) são os mais importantes na suinocultura – 80% das linhagens de *E. rhusiopathiae* isoladas de suínos pertencem aos sorotipos 1a, 1b e 2b (WOOD e HARRINGTON JR, 1978). Em um estudo recente, 151 isolados de *Erysipelothrix* spp. de suínos no Brasil foram genotipados e o sorotipo 2b apresentou a maior frequência (39,7 %) entre as amostras analisadas (COUTINHO *et al.*, 2011). O crescimento do microrganismo ocorre em temperaturas de 15 a 44°C, com a temperatura ótima variando entre 30 e 37°C. O pH ótimo situa-se na faixa de 7,2 a 7,6, mas pode variar entre 6,7 e 9,2 (SNEATH *et al.*, 1951).

O microrganismo é ubíquo e capaz de persistir por um longo período de tempo no ambiente, inclusive em locais marinhos. Encontra-se também como um organismo patogênico ou comensal em uma grande variedade de animais domésticos e selvagens, pássaros e peixes (WANG *et al.*, 2010). Estima-se que de 30 a 50 % dos suínos sadios alojam o microrganismo em suas tonsilas e órgãos linfóides (WOOD, 1992).

O primeiro seqüenciamento do genoma da espécie *E. rhusiopathiae*, linhagem Fujisawa, foi recentemente publicado (OGAWA *et al.*, 2011). Foram identificados diversos genes de fatores de virulência associados à parede celular, como os de biossíntese da cápsula polissacarídica e de algumas adesinas, além de outros ligados a capacidade do microrganismo sobreviver no interior de fagócitos. Também foi descrita a falta de genes para a biossíntese de aminoácidos, cofatores e vitaminas, bem como para as enzimas do ciclo do ácido cítrico (OGAWA *et al.*, 2011).

2.1.1 Patologias provocadas pelo microrganismo

Os maiores impactos comerciais provocados por infecções causadas por *E. rhusiopathiae* estão relacionados a doenças nos suínos, porém infecções em carneiros, perus e patos também são de importância econômica (CONKLIN e STEELE, 1979).

Em suínos, *E. rhusiopathiae* causa a erisipela, também conhecida como “ruiva dos suínos”, enfermidade do tipo hemorrágica que pode provocar septicemia aguda ou subaguda e lesões crônicas proliferativas (WANG *et al.*, 2010). A forma aguda é caracterizada por morte repentina ou sinais gerais de septicemia. A forma subaguda mostra sinais menos severos que a forma aguda, e lesões de pele na forma de diamantes, de cor púrpura, situadas no abdômen e no dorso dos animais podem ser vistas no segundo ou terceiro dia após infecção. Essa forma menos severa da doença pode ser resultante de infecção com linhagens menos virulentas, contaminação com menor dose do patógeno, ou ainda por proteção parcial pré-existente, promovida por anticorpos protetores de origem materna ou por vacinação (BRADFORD e SHIVE, 1998). A forma crônica é caracterizada por sinais de artrite local e endocardite. A artrite crônica é a manifestação clínica mais importante da erisipela suína do ponto de vista econômico (WANG *et al.*, 2010). Também podem ocorrer falhas reprodutivas: nos machos a doença afeta a produção das células espermiogênicas, e nas fêmeas pode induzir o aborto.

Em humanos, *E. rhusiopathiae* causa três tipos de quadros clínicos. O mais comum consiste em uma lesão cutânea localizada chamada de erisipelóide (assim denominada para diferenciá-la da erisipela humana causada por estreptococos), ocorrendo geralmente nas mãos e dedos, podendo haver inflamação nas

articulações da região. Os outros quadros incluem uma lesão de pele generalizada, e casos raros de uma forma septicêmica geralmente associada à endocardite (BROOKE e RILEY, 1999), tendo sido relatados na literatura cerca de 80 casos de endocardite (TOMASZUK-KAZBERUK *et al.*, 2011). A infecção por *E. rhusiopathiae* é caracterizada como doença ocupacional, acometendo pessoas que trabalham com manipulação ou processamento de carne, agricultores, pescadores, veterinários, trabalhadores de curtumes, laboratoristas entre outros (REBOLI e FARRAR, 1989). A contaminação ocorre através de ferimentos na pele, sendo muito rara a ocorrência de outras vias de penetração (STRAW *et al.*, 1999).

2.1.2. Fatores de virulência

Foi descrita a presença de uma cápsula neste microrganismo, e a mesma foi identificada como um antígeno não protéico com massa molecular de 14 a 22 kDa (LACHMANN e DEICHER, 1986). Estudos posteriores revelaram que esta estrutura estava relacionada com a patogenicidade, sendo responsável pela resistência da bactéria à fagocitose, e mutantes sem cápsula se mostraram avirulentos em testes com camundongos (SHIMOJI *et al.*, 1994). O seqüenciamento do genoma revelou que o microrganismo possui um *cluster* de genes (ERH_0855 a ERH_0861) que codifica sete proteínas que parecem estar envolvidas na biossíntese do polissacarídeo capsular (OGAWA *et al.*, 2011).

Outro fator de virulência identificado é a enzima neuraminidase (SHIMOJI, 2000) que tem importante papel na adesão da bactéria e subsequente invasão das células hospedeiras. Foram identificados dois genes que codificam neuraminidases no genoma de *E. rhusiopathiae*, sendo que aparentemente uma delas (ERH_0299) está exposta na superfície da bactéria (ancorada por motivo LPXTG) enquanto a outra (ERH_0761) é secretada no meio extracelular (OGAWA *et al.*, 2011).

A enzima hialuronidase, que facilita a disseminação de alguns patógenos nos tecidos do hospedeiro, foi detectada em linhagens virulentas e avirulentas de *E. rhusiopathiae*, mas seu papel na patogênese da doença causada pela bactéria permanece não confirmada. Alguns autores sugerem que essa enzima não apresenta papel essencial no mecanismo de infecção (SHIMOJI *et al.*, 1994). Foram anotados três genes no genoma seqüenciado que codificam hialuronidases (ERH_0150, 0765 e 1210).

A patogenicidade de *E. rhusiopathiae* está principalmente relacionada à sua habilidade de sobrevivência no interior das células dos organismos infectados. Na ausência de anticorpos específicos, o organismo evade a fagocitose pelas células fagocitárias e, se for fagocitado, é capaz de se replicar no interior dessas células (SHIMOJI, 2000). Os dados do genoma apontam para a existência de nove fatores antioxidantes, que potencialmente conferem ao microrganismo resistência a espécies reativas de oxigênio (ROS), além de nove fosfolipases, que são consideradas fatores de virulência em muitos outros patógenos intracelulares (SCHMIEL e MILLER, 1999) e que devem permitir ao microrganismo o escape do fagossomo para o citoplasma da célula pelo rompimento da membrana fagossomal (OGAWA *et al.*, 2011).

O processo de adesão também parece ser um fator importante na virulência de *E. rhusiopathiae*, e duas adesinas (RspA e RspB) já haviam sido identificadas neste microrganismo (SHIMOJI *et al.*, 2003) antes do seqüenciamento do genoma do mesmo. Além destas, outras 22 proteínas de superfície foram descritas como possíveis fatores de virulência desta bactéria após o seqüenciamento do genoma (OGAWA *et al.*, 2011).

Os sistemas de transdução de sinais de dois componentes estão presentes em grande número neste microrganismo, e considerando seu papel importante na resposta a situações de estresse, acredita-se que também estejam relacionados com a virulência de *E. rhusiopathiae* (OGAWA *et al.*, 2011).

2.1.3. Principais antígenos

Trabalhos relatando a identificação e caracterização de diferentes antígenos em culturas de diversas linhagens de *E. rhusiopathiae* vêm sendo publicados desde a década de 70, como descrito a seguir.

Um complexo glicolipoprotéico de 200 kDa foi descrito como um antígeno protetor extraído do sobrenadante do meio de cultura (WHITE e VERWEY, 1970). Posteriormente, foi descrito um antígeno protéico de 66-64 kDa, que estava presente tanto na parede celular como no meio de cultura (LACHMANN *et al.*, 1986).

Em 1990, o gene correspondente a essa proteína da linhagem virulenta E1-6P de *E. rhusiopathiae* foi clonado e expresso fusionado à β -galactosidase em *E. coli* (GALAN e TIMONEY, 1990). Essa proteína recombinante ofereceu proteção

incompleta nos testes de imunização com camundongos e atribuiu-se essa baixa atividade antigênica a possíveis alterações na conformação da proteína devido à fusão com a β -galactosidase.

Diferentes tratamentos (adição de ácido quente, de NaOH 10 mM, aplicação de ultra-som ou adição de EDTA) foram investigados para obtenção de antígenos de *E. rhusiopathiae* (linhagens T 28 – sorotipo 2b, e Frankfurt XI – sorotipo N) tanto do sobrenadante como de extratos celulares (GROSCHUP *et al.*, 1991). Os tratamentos com EDTA e com NaOH 10 mM produziram extratos altamente protetores, enquanto que o sobrenadante mostrou-se menos protetor.

Uma proteína de 66-64 kDa de *E. rhusiopathiae* da linhagem Frankfurt XI, sorotipo N foi isolada (TIMONEY e GROSCHUP, 1993). Entretanto, a imunização de camundongos exclusivamente com a proteína isolada não levou à proteção alcançada com imunizações utilizando extratos brutos obtidos com NaOH 10mM ou EDTA. Os autores sugeriram que formas de altas massas moleculares do antígeno formando complexos com glicolípídeos em extratos brutos, análogos ao complexo glicolipoprotéico de 200 kDa, poderiam ser mais imunogênicos do que o antígeno 66-64 kDa purificado.

No ano seguinte, um grupo de pesquisadores sugeriu que o complexo glicolipoprotéico de 200 kDa descrito anteriormente por WHITE E VERVEY (1990) seria a cápsula do microrganismo, por esta estrutura estar relacionada com a proteção e também estar presente no sobrenadante do cultivo (segundo os autores a cápsula é facilmente removida da superfície da parede da bactéria) (SHIMOJI *et al.*, 1994). Porém, apesar da cápsula ser um fator determinante de virulência, ela é fracamente imunogênica e um teste feito com camundongos imunizados com a cápsula purificada não ofereceu proteção frente ao desafio com uma linhagem virulenta, sugerindo que uma molécula na superfície da célula, diferente da cápsula, deve ser importante na indução da produção de anticorpos protetores.

Um antígeno contendo proteínas de 64 e 66 kDa (denominado pelos autores como P64) foi purificado a partir da linhagem Agata (sorotipo 5), e doses de 500 e 100 μ g desse antígeno ofereceram o mesmo grau de proteção que a vacina com o microrganismo atenuado em testes de imunização realizados em suínos (YAMAZAKI *et al.*, 1999).

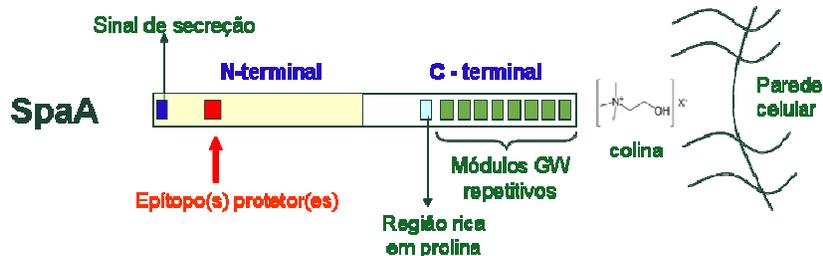
Experimentos com anticorpos monoclonais (MAbs) reconheceram dois diferentes epítomos em uma mesma proteína de 67 kDa presente na extração com

NaOH das células do microrganismo (KITAJIMA *et al.*, 2000). Os autores estudaram quinze diferentes linhagens de *E. rhusiopathiae* que demonstraram apresentar diferentes quantidades do antígeno de 67 kDa e os resultados dos testes de imunização em camundongos indicaram que as bacterinas com maior concentração deste antígeno ofereceram maiores níveis de proteção.

Um antígeno de *E. rhusiopathiae* (sorotipo 2, linhagem Tama-96) de 606 resíduos de aminoácidos e 64 kDa designado como SpaA (surface protective antigen A) foi produzido em *E. coli* e os autores sugeriram que a região C-terminal desta proteína poderia ser candidata a uma vacina de subunidade contra a erisipela (MAKINO *et al.*, 1998). O epítipo protetor da SpaA foi localizado na região N-terminal (SHIMOJI *et al.*, 1999) e posteriormente uma proteína truncada contendo essa região mais um hexâmero de histidina foi produzida (IMADA *et al.*, 1999) e conferiu proteção em suínos nos testes de imunização contra linhagens virulentas de *E. rhusiopathiae* sorotipos 1a e 2b (linhagens Fujisawa e 82-875 respectivamente). Foi observada também reação do antisoro tanto de camundongos quanto de suínos com uma proteína de 43 kDa, identificada como um fragmento da SpaA.

A análise da seqüência de aminoácidos da SpaA revelou uma região C-terminal composta por oito repetições de vinte aminoácidos cada, iniciadas pelo dipeptídeo glicina-triptofano (GW) (MAKINO *et al.*, 1998). Uma proteína com 597 aminoácidos mais um peptídeo sinal de 29 aminoácidos, resultando numa proteína de 69 kDa foi descrita a partir da linhagem Fujisawa, sorotipo 1a (SHIMOJI *et al.*, 1999), e devido a sua grande semelhança com a SpaA esta foi denominada de SpaA.1. Esta proteína possui em sua região C-terminal o mesmo módulo GW, porém apresenta nove repetições. A Figura 2.1 apresenta um esquema representativo da proteína SpaA, sua seqüência codificadora e de aminoácidos (DDBJ/EMLB/GenBank Accession Number AB019124).

Figura 2.1 – Esquema representativo da proteína SpaA de *E. rhusiopathiae*, seqüência do gene *spaA* e respectiva tradução.



```
>gi|5881761|dbj|AB019124.1| Erysipelothrix rhusiopathiae spaA gene,
complete cds
ATGAAAAAGAAAAACACCTATTTCCGAAAGTAAGTCTTATGTCGTGCTTACTTTTAAACAGCAATGCCAC
TACAAACAGCTTTTGTGCTGATTCGACAGATATTTCTGTGATTCCACTAATCGGTGAACAAGTTGGATTGCT
CCCAGTTTTACCTGGGACAGGGGTACATGCTCAGGAATACAACAAAATGACTGATGCTTATATTGAAAAA
TTGGTATCTCTAATTAATCAAAAAGTGAAGCCGTTTCTTATAAATGAGCCAAAGGGGTACCAAAGTTTCG
AAGCAGTGAATGAAGAGATTAAGTTCGATTGTAAGTGAAGTAAATAAAGGAATGAGTCTTCAAAACAT
TCACCATATGTTTTAAACAAGCATCCAAAACCTAGCAACTAGAATCGGCTACAGAAGTTTTATGCAGGAT
GCTATGTATCTTGAAAAATTTTGAAAGATTAACGATTCCTGAAGTGAAGCATAACGTTGATTACTCG
TGAATTACGAGGTGAAACACCGTATTTTAGTAAAATATGAAGGTAAAGTTAAAGGTAGAGCTCCCTTAGA
AGCATTATAGTTCCTCTAAGAGATAGAATTCGTAGTATGAATGAAATTGCTGCAGAAGTAAATTATTTA
CCTGAAGCGCATGAGGATTTCTTAGTTTCAGATTCAAGCGAGTATAATGACAACTAAATAATATCAACT
TTGCTTTGGGTCTAGGGTCTAGCGAGTTTATTGACTATAACCGGCTCGAAAAATATGATGGAAAAAGAACT
TCATCCACTGTATCTTGAAGTCTTATGCTATGCGGAGAAAAATCGCCAAATTCAGTTGTAAGAGATGTATAT
CCAAACTTGGAACGTGCGAACGCGGTTGTTGAATCCTTAAAGACAATTAAGATATAAAACAAAGAGGGA
AGAAACTACAGGAATCTTGAAGTATATCCAAAGAAGTGGAGATGTTGCGAAAACAGATGTACTCCA
ACGATTTATTGGAAAAATATCAATCAGTAGTTGATGAAGAAAAAATAAACTTCAAGATTATTTAGAAATCA
GATATTTTTGATTCATATAGTGTGGATGGCGAGAAAAATAAGAAATAAAGAAATTAACACTCATCAATAGAG
ATGCATACTTATCTATGATTTACAGAGCTCAATCGATTTGCGAAATTAAGACGATTCGTGCAGATTTAGA
ATCACTTGTCAAATCATTCCAAAATGAAGAAAGTACTCTAAAGTAGAGCCTGAAAGTCCCGTTAAAGTA
GAAAAACAGTTGATGAAGAAAAACCTAAAGATCAAAGAAGCTAGTTGATCAATCAAAACCCGAATCGA
ATTCAAAAGAAGGGTGGATTAAGAAAGATAATAAGTGGTCTATATTGAGAAATCAGGTGGAATGGCAAC
AGGTGGAAGAAGGTAGCAGACAAATGGTACTACCTCGATAATACGGGTGCTATAGTTACGGGTGGAAG
AAGGTAGCAACAAATGGTACTATCTTGAAAAATCAGGTGCGATGGCAACAGGATGGAAGAAAGTATCAA
ACAAGTGGTACTACCTTGAAAACTCAGGTGCAATGGCAACAGGATGGAAGAAAGTATCAAACAAGTGGTA
CTACCTTGAAAAATTCAGGCGCAATGGCTACAGGATGGAAGAAAGGTAGCAACAAATGGTACTACCTTGAA
AACTCAGGTGCGATGGCAACAGGATGGAAGAAAGTATCGAACAAGTGGTACTACCTTGAAAACTCAGGCG
CAATGGCTACAGGATGGAAGAAAGGTAGCAACAAATGGTACTACCTTGATAAATCAGGAATGATGGTTAC
AGGTTCAAAATCTATTGATGGTAAAAAGTATGCATTTAAGAACGATGGAAGTTAAAAATAG
```

```
>gi|5881762|dbj|BAA84452.1| spaA [Erysipelothrix rhusiopathiae]
MKKKKHLFPKVSLMSCLLLTAMPLQTAFAADSTDISVIPLIGEQVGLLPVLPVPGTVHQAQYENKMTDAYIEK
LVSLINQKVKPFLINEPKYQSFEAVNEEINSIVSELKNEGMSLQNIHMFQSQSIQNLATRIGYRSFMQD
AMYLENFERLTIPELDEAYVDLLVNYEVKHRILVKYEGKVKGRAPLEAFIVPLRDRIRSMNEIAAEVNYL
PEAHEDFLVSDSSEYNDKLNININFALGLGVSEFIDYNRLENMMEKELHPLYLELYAMRRNRQIQVVRDVY
PNLERANAVVESLKTIKDIKQRGKKLQELLEIYIQRSGDVRKPDVLRQFIGKYQSVVDEEKNKLQDYLES
DIFDSYSVDGEKIRNKEITLINRDAYLSMIYRAQSISEIKTIRADLESVKSFNQNEESDSKVEPESPVKV
EKPVDDEKPKDQKKLVDQSKPESNSKEGWIKKDNKWFYIEKSGGMATGWKKVADKWYYLDNTGAIVTGWK
KVANKWYYLEKSGAMATGWKKVSNKWYYLENSGAMATGWKKVSNKWYYLENSGAMATGWKKVANKWYYLE
NSGAMATGWKKVSNKWYYLENSGAMATGWKKVANKWYYLDKSGMMVTGSKSIDGKKYAFKNDGSLK
```

Fonte: *GenBank* Acession Number AB019124.

Fragmentos das proteínas de adesão RspA e RspB (*rhusiopathiae* Surface Protein) foram expressos em *E. coli* e no desafio realizado com camundongos imunizados com essas proteínas a RspA ofereceu proteção parcial, sendo identificada como um novo antígeno de *E. rhusiopathiae* (SHIMOJI *et al.*, 2003).

Em 2004 um novo sistema de vacinação foi proposto com a SpaA sendo produzida em *Lactococcus lactis* (CHEUN *et al.*, 2004). A vacinação oral e nasal com esse microrganismo recombinante ofereceu proteção a todos os camundongos desafiados com 100 LD₅₀ da linhagem virulenta Tama-96 de *E. rhusiopathiae*.

Um polipeptídeo de 46,5 kDa preparado a partir da SpaA, porém sem o peptídeo sinal da região N-terminal e sem as seqüências de repetições do módulo GW da região C-terminal foi reportado como um possível antígeno protetor denominado de 46,5 KPA (WATANABE *et al.*, 2000). Os autores patentearam o processo de produção dessa proteína em *Brevibacillus choshinensis*. Neste sistema de expressão, a proteína é excretada para o meio de cultivo e cerca de 50% do produto se torna insolúvel por um processo de coagulação na cultura. A obtenção do material insolúvel é realizada por ultrafiltração, seguida por solubilização em meio alcalino. O antígeno é então purificado por cromatografia de troca iônica.

Uma nova patente foi depositada em 2005 descrevendo um processo de produção desse antígeno com algumas mutações em seu gene codante para se obter a SpaA insolúvel, nos corpos de inclusão do microrganismo. Assim, segundo os autores, a proteína é obtida com alto grau de pureza através de etapas simples de centrifugação e lavagem após lise celular (USHIJIMA *et al.*, 2005).

Recentemente foi reportada a descoberta de dois tipos adicionais de proteínas Spa (Surface protective antigen) de *E. rhusiopathiae*: SpaB e SpaC (TO e NAGAI, 2007). Nesse estudo cada tipo de proteína Spa foi descrito como sendo expresso por diferentes grupos de sorotipos da bactéria, mas mostrou-se depois que o tipo de Spa expresso não é restrito a sorotipos específicos (INGEBRITSON *et al.*, 2010). Foi sugerido que a proteína SpaC apresenta maior espectro de proteção cruzada em experimentos de desafio realizados com diferentes sorotipos do microrganismo (TO *et al.*, 2007), e em um novo estudo, um fragmento recombinante contendo a porção N-terminal da proteína SpaC conferiu proteção em experimentos com camundongos e suínos desafiados com sorotipos produtores de outros tipos de Spa (SpaA e SpaB) e também SpaC (TO *et al.*, 2010).

2.1.4 Estimulação da resposta imune e vacinas atualmente disponíveis

Na infecção provocada por *E. rhusiopathiae*, tanto a imunidade humoral quanto a mediada por células tem um papel importante na defesa do organismo infectado (SHIMOJI, 2000).

O papel protetor de anticorpos específicos na infecção é atestado pela imunização com bacterinas (formulações com células inativadas do patógeno) ou tratamento com antisoro para o controle da doença. A atividade protetora dos soros imunes está relacionada à ação de opsonização de anticorpos IgG (SHIMOJI *et al.*, 1994) e a proteína SpaA é capaz de induzir a produção desses anticorpos protetores (IMADA *et al.*, 1999).

O papel da imunidade celular na proteção contra a erisipela suína foi demonstrado usando uma linhagem mutante de *E. rhusiopathiae* sem cápsula (SHIMOJI *et al.*, 1994). Experimentos de imunização usando essa linhagem viva em camundongos resultaram em uma proteção completa e de longa duração. A proliferação de células do baço coletadas após imunização em resposta a antígenos do patógeno, e o efeito de proteção cruzada destas células contra outro patógeno intracelular antigenicamente não relacionado (*L. monocytogenes*) mostraram que a imunidade mediada por células foi induzida (SHIMOJI, 2000).

As vacinas atualmente utilizadas para a prevenção da erisipela suína são produzidas com o microrganismo atenuado ou inativado, porém nenhuma das duas formulações protege os animais contra a forma crônica da doença. Tem sido sugerido que o uso dessas vacinas celulares pode agravar os problemas de artrite pela hipersensibilização do animal a contatos subseqüentes com o microrganismo (FREEMAN, 1964; WOOD, 1992). A duração da imunidade estimulada por essas vacinas varia entre 6 e 12 meses e a eficácia varia de acordo com a linhagem utilizada (SWAN e LINDSEY, 1998). Ocorrem falhas na imunização com certa frequência: IMADA e colaboradores (2004) reportaram que 37 % dos casos de erisipela suína crônica detectada nos 11 anos anteriores ocorreram como resultado da falha da vacina viva atenuada; EAMENS e colaboradores (2006) também reportaram falhas da vacina na Austrália.

Por essas razões, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de identificar os componentes antigênicos de *E. rhusiopathiae* para a produção de uma

vacina de subunidade antigênica que seja mais segura e ofereça proteção contra ambas as formas da doença.

Além disso, a produção de vacinas celulares, sejam atenuadas ou inativadas, envolve o cultivo em larga escala dos respectivos agentes infecciosos, tendo como desvantagens os riscos inerentes à manipulação de organismos patogênicos e a dificuldade de cultivo dos mesmos em alta densidade. Já na produção de vacinas baseadas em subunidades antigênicas ou em vetores bacterianos vivos (VBVs) são utilizados organismos não virulentos ou atenuados, os quais são geneticamente modificados para potencializar a expressão do antígeno de interesse ou a capacidade de induzir uma resposta imune mais completa.

2.2 VACINAS DE SUBUNIDADE

Esta classe de vacinas está baseada no fato do sistema imune necessitar apenas de pequenas partes específicas de um patógeno para reconhecê-lo, de forma que se torna possível estimular uma resposta protetora no indivíduo vacinado sem a necessidade de se fazer uso das células inteiras do agente infeccioso. Dessa maneira, a imunização pode ser realizada com a aplicação apenas de uma proteína antigênica de uma bactéria específica, por exemplo.

Na prática, o princípio básico de uma vacina de subunidade é que o gene que codifica o antígeno dessa vacina (no caso de antígenos protéicos) é isolado e transferido para um segundo organismo, normalmente não patogênico. A vacina de subunidade recombinante é então produzida no hospedeiro heterólogo e pode ser projetada para ser veiculada como um imunógeno purificado, um ácido nucléico, ou por meio de vetores específicos (LILJEQVIST e STAHL, 1999).

Entre as vantagens do uso dessas novas tecnologias está a eliminação dos riscos inerentes associados com o cultivo de microrganismos patogênicos, bem como riscos de reversão à patogenicidade existente nas vacinas de patógenos atenuados, ou ainda de inativação incompleta para as formulações preparadas com microrganismos inativados. Além disso, é possível buscar alternativas às vacinas atualmente em uso com menores efeitos colaterais e maior eficácia, e também desenvolver vacinas para novas doenças.

2.2.1 Vacinas de proteínas recombinantes

Seguindo os avanços da tecnologia do DNA recombinante e a identificação de componentes antigênicos de diversos patógenos no campo da imunologia, surgiu a oportunidade de se produzir vacinas livres de células, compostas por proteínas recombinantes capazes de estimular o sistema imunológico do organismo vacinado. Tal tecnologia se beneficiou das diversas ferramentas desenvolvidas para a produção de proteínas recombinantes em geral, de forma que uma vasta gama de sistemas de expressão e estratégias de expressão e purificação pode ser aplicada hoje para a produção dessas vacinas de subunidade, aumentando sua aplicabilidade e potencializando sua imunogenicidade.

De fato, a maior parte dos esforços empregados no desenvolvimento destas vacinas tem se concentrado no desenvolvimento de estratégias que aumentem o grau de imunogenicidade apresentado pelos antígenos vacinais, bem como sua estabilidade. Dentre estas estratégias, destaca-se a fusão da proteína antigênica com outras proteínas que agregam características desejáveis ao antígeno, como por exemplo, a melhora de sua estabilidade, o aumento de seu potencial imunogênico ou mesmo a capacidade de direcionar sua apresentação ao sistema imunológico (LILJEQVIST e STAHL, 1999).

O principal sistema de expressão desses antígenos recombinantes são os organismos procariontes, principalmente a bactéria *Escherichia coli* (LILJEQVIST e STAHL, 1999), devido ao baixo custo de produção e diversas outras características dessa que é a plataforma de expressão mais utilizada para a produção de proteínas recombinantes. Apesar disso, como pode ser visto no Quadro 2.1, outros sistemas também podem ser empregados para a produção destas proteínas dependendo das características e necessidades especiais de cada produto.

Quadro 2.1 – Hospedeiros para a produção de proteínas recombinantes

Hospedeiro	Características típicas
Bactéria	Bem caracterizado. Muitas ferramentas genéticas disponíveis. Altos rendimentos de produção. Produção com bom custo-benefício. <i>E. coli</i> como principal bactéria. Sem modificações pós-traducionais.
Levedura	Bem caracterizado. Várias técnicas para manipulação genética. Produção com bom custo-benefício. Modificações pós-traducionais, exceto glicosilação, semelhante a eucariotos superiores. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como principal levedura. Possibilidade de rendimentos maiores com <i>Pichia pastoris</i> .
Células de inseto	Baculovírus e sistemas de expressão com plasmídeos disponíveis. Mais barato que linhagens de células de mamífero. Possibilidade de produção em larga escala. Infecção por vírus pode prejudicar as células de inseto, levando a baixos rendimentos. Glicobiologia diferente das células de mamífero.
Células de planta	Fase de pesquisa cara. Produção barata. Modificações pós-traducionais existem. Sistema de veiculação oral para antígenos por plantas comestíveis. Doses inexatas.
Células de mamífero	Modificações pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação, e adição de cadeias de ácidos graxos. Caras para cultivar. Expressão transiente relativamente rápida de ser alcançada, apropriada para pequenas quantidades de proteína. Criação de linhagens estáveis de células de produção laboriosa, mas com rendimentos maiores.
Animais transgênicos	Expressão de interesse pela glândula mamária. Produção diária. Fácil acesso à proteína. Modificações pós-traducionais adequadas para proteínas terapêuticas. Fase de pesquisa cara e tediosa. Provavelmente cara demais para produção de vacinas.

Fonte: Adaptado de LILJEQVIST e STAHL, (1999).

Evidentemente existem algumas desvantagens dessa classe de vacinas. Além do risco de serem menos eficientes, vacinas de subunidades antigênicas são de obtenção mais complexa e apresentam maior custo do que as de células inativadas ou atenuadas, devido aos processos de separação e purificação empregados para isolamento dos antígenos. Além disso, geralmente há também necessidade de combinar as proteínas recombinantes com algum adjuvante. A composição desses adjuvantes, a estrutura das proteínas recombinantes e o modo de administração das vacinas têm um forte impacto na resposta imune e no nível de proteção contra os patógenos, que não pode ser completamente predito. Por isso, a eficiência da vacina recombinante dificilmente pode ser prevista. Por fim, múltiplas proteínas e vários modos de administração devem ser avaliados empiricamente e especificamente para cada caso (SOLER e HOUDEBINE, 2007).

2.3 CULTIVOS DE *E. coli* RECOMBINANTE EM ALTA DENSIDADE CELULAR

O cultivo de *E. coli* em alta densidade tem sido por muito tempo o método de escolha para a produção de proteínas recombinantes, e dessa forma a obtenção de altas concentrações celulares e o aumento na produtividade volumétrica constituem os principais objetivos de qualquer processo baseado no cultivo de linhagens recombinantes deste microrganismo (SHILOACH e FASS, 2005).

As estratégias de pesquisa para alcançar estes objetivos são basicamente a melhoria das técnicas de cultivo e a manipulação da fisiologia da bactéria. Acerca dos processos de cultivo, o uso de biorreatores operados em batelada alimentada tem sido empregado com sucesso por longa data para a formação de grandes quantidades de biomassa. Os principais obstáculos que precisam ser superados nesta estratégia de cultivo são a formação de subprodutos tóxicos, o acúmulo de substrato e o suprimento de oxigênio.

Neste processo, a fase de alimentação é a etapa que requer maior atenção. Nesta fase o controle sobre a velocidade específica de crescimento torna-se crítico uma vez que influencia a formação de metabólitos, a produtividade celular e a estabilidade do vetor recombinante. O crescimento exponencial de culturas de *E. coli* em alta densidade não deve exceder 50 g/L de massa seca (SHILOACH e BAUER, 1975), enquanto culturas cultivadas com baixas velocidades de crescimento podem atingir 190 g/L de massa seca, desde que obstáculos metabólicos estejam resolvidos (NAKANO *et al.*, 1997). A velocidade de crescimento também está diretamente relacionada com a formação de subprodutos tóxicos do metabolismo. A formação de acetato, por exemplo, ocorre em meios complexos e definidos contendo glicose quando a velocidade específica de crescimento ultrapassa 0,2 ou 0,35 h⁻¹, respectivamente (PAALME *et al.*, 1990; MEYER *et al.*, 1984). Além disso, a velocidade crítica de crescimento que leva à formação de acetato está relacionada à linhagem e ao meio de cultivo empregado.

Altas velocidades de transferência de oxigênio são requeridas para a obtenção de altas densidades celulares sem formação de ácidos orgânicos que inibam o crescimento celular e limitem a expressão de proteínas recombinantes (DE MEY *et al.*, 2007). A manutenção de baixas velocidades de crescimento sob um regime de alimentação controlada é geralmente empregada para facilitar o controle sobre a oxigenação do meio e evitar a condição onde a capacidade oxidativa das

células é ultrapassada provocando conseqüente formação de produtos tóxicos que comprometem a condição ótima de operação (LEE, 1996).

A formação de acetato está entre os principais fatores que podem interferir na obtenção de altas densidades celulares. Em condições de aerobiose, a formação deste metabólito está associada ao crescimento em excesso de fonte de carbono. No caso do crescimento em excesso de glicose, por exemplo, o acúmulo de acetato está relacionado com a alta velocidade de crescimento, que provoca sobrecarga no ciclo TCA e gera a ativação das vias fermentativas. Em condições de falta de oxigênio estas vias também são ativadas e os ácidos orgânicos que inibem o crescimento passam a ser produzidos. Em geral, concentrações de acetato acima de 2,0 g/L diminuem a velocidade de crescimento da *E. coli* e podem prejudicar a biossíntese de proteínas recombinantes (SHILOACH e FASS, 2005). Entre os efeitos tóxicos provocados pelos ácidos orgânicos de cadeia curta, como o ácido acético, pode-se citar a redução na velocidade de síntese de RNA, DNA, proteínas e lipídeos. Além disso, o aceto afeta várias proteínas e genes, particularmente aqueles envolvidos na maquinaria de transcrição-tradução, e regulação e resposta ao estresse, e também interfere na biossíntese de metionina, provocando o acúmulo de homocisteína, que é um inibidor do crescimento celular (Eiteman e Altman, 2006).

A escolha do meio de cultivo naturalmente influencia a formação de biomassa e os demais parâmetros do processo, como formação de metabólitos e produção da proteína de interesse. As principais fontes de carbono em uso são a glicose e o glicerol, em meios com formulações definidas, semi-definidas ou complexas. O Quadro 2.2 traz alguns exemplos de concentrações celulares máximas atingidas em diferentes meios e pelo uso de diferentes técnicas de cultivo.

Quadro 2.2 – Densidades celulares máximas atingidas em cultivos de *E. coli* por diferentes técnicas de cultivo

Técnica de propagação	Meio básico	Fonte de C	Rendimento g _{DCW} /L	Referência
<i>Batelada alimentada</i>				
1. Crescimento exponencial	Meio semi-definido com extrato de levedura	Glicose	54	Shiloach e Bauer, 1975
2. Crescimento linear limitado pela fonte de C	Meio definido	Glicose sólida	134	Neidhardt <i>et al.</i> , 1974 Matsui <i>et al.</i> , 1989
	Meio definido	Glicose Ácido cítrico	104	Riesenberg <i>et al.</i> , 1990
	Meio definido	Glicerol Glicose	148 128	Korz <i>et al.</i> , 1995
	Hidrolisado protéico e extrato de levedura	Glicerol	84	Macaloney <i>et al.</i> , 1996
3. Crescimento linear lento para manter concentração de acetato próxima a zero	Meio definido	Baixa glicose Glicerol	145	Horn <i>et al.</i> , 1996
<i>Diálise</i>				
1. Reator com membrana de diálise	Contra o meio de crescimento completo	Glicerol	174	Märkl <i>et al.</i> , 1993
	Contra meio basal	Glicerol	190	Nakano <i>et al.</i> , 1997
2. Alimentação "nutrient-split"	Contra solução tampão de sais	Glicerol alimentado separada/e	150	Ogbonna e Märkl, 1993

Fonte: Adaptado de SHILOACH e FASS, (2005).

Em cultivos de alta densidade de *E. coli* recombinante a produção da proteína de interesse está relacionada a diversos fatores, entre eles o momento da indução e a natureza do indutor utilizado para promover sua expressão. Ambos os fatores afetam também o crescimento celular, e diversos estudos tem sido desenvolvidos para avaliar o efeito de diferentes indutores (IPTG, lactose, choque-térmico, etc) na formação de biomassa e produção de proteínas recombinantes (ZABRISKIE e ARCURI, 1996; SEEGER *et al.*, 1995; GOMBERT e KILIKIAN, 1998).

Para o caso de cultivos de alta densidade em frascos agitados, STUDIER (2005) propôs a formulação de meios de auto-indução para proteínas recombinantes cuja expressão está sob o controle do *operon lac*. Nestes meios, a lactose, indutor

natural deste promotor, está presente na formulação desde o início, juntamente com outras fontes de carbono. Dessa forma, a expressão da proteína de interesse ocorre a partir do momento em que o microrganismo passa a consumir a lactose, sem que seja necessária a adição posterior de um indutor.

Diversas linhagens de *E. coli* são empregadas para a produção de proteínas recombinantes, e entre as mais utilizadas está a linhagem BL21(DE3). Esta linhagem é ideal para uso com sistemas de expressão baseados no promotor do bacteriófago T7, como os sistemas pET, pRSET e pCRT7, por exemplo. Em geral, as linhagens de *E. coli* B são mais empregadas que as linhagens derivadas da *E. coli* K12 por possuírem a via do glicoxalato ativada e produzirem assim menos acetato (Eiteman e Altman, 2006).

are ideal for use with bacteriophage T7 promoter-based expression systems (e.g., pRSET, pCR α T7, and pET).

2.4 VACINAS DE VETORES BACTERIANOS VIVOS

Em decorrência do melhor entendimento sobre o funcionamento do sistema imunológico e dos avanços da tecnologia do DNA recombinante, novos sistemas de vacinação vêm sendo investigados nos últimos anos, e dentre estes novos sistemas encontra-se a utilização de bactérias patogênicas atenuadas como veículos para antígenos heterólogos (LILJEQVIST e STAHL, 1999). Esses vetores bacterianos vivos permitem o desenvolvimento de uma tecnologia de produção de vacinas com larga aplicabilidade, por apresentarem alta imunogenicidade e facilidade de manipulação genética (GENTSCHEV *et al.*, 2002a). Além disso, outros atributos vantajosos característicos destes sistemas são (SHATA *et al.*, 2000, modificado): custo de produção relativamente barato, sendo apropriados para administração em larga escala; capacidade natural de induzir resposta imunológica mediada por células; possibilidade de administração por via oral ou nasal, facilitando e tornando mais prática a aplicação da vacina; baixo risco de reversão à forma patogênica em sistemas imunológicos debilitados, já que a redução de virulência é obtida por manipulação genética; possibilidade de desenvolvimento de vacinas de mucosa.

Vacinas administradas via mucosa são especialmente promissoras. Elas mimetizam a resposta imune induzida por uma infecção natural e podem levar a respostas imunológicas sistêmicas e das mucosas mais duradouras (MCGHEE *et*

al., 1992; SHATA *et al.*, 2000). Mais ainda, a vacinação através desta rota é também associada a menores índices de efeitos colaterais e em muitos casos apresenta menores custos de aplicação (GENTSCHEV *et al.*, 2002a). Além disso, pelo fato das superfícies das mucosas constituírem as portas de entrada da maioria dos agentes infecciosos - inclusive de *E. rhusiopathiae*, que inicialmente coloniza a mucosa oral, nasal ou da faringe (YOKOMIZO *et al.*, 2002), podemos esperar que a imunização via mucosas deva não somente levar a uma forte resposta imune sistêmica, mas também barrar os patógenos no seu ponto de entrada (LOCHT, 2000).

Como as bactérias patogênicas são particularmente bem adaptadas para interagir com a superfície das mucosas, uma vez que a maioria delas utiliza esta interação para iniciar o processo de infecção, certas espécies dessas bactérias patogênicas atenuadas têm sido extensivamente estudadas para esta finalidade. Dentre as mais utilizadas, encontram-se mutantes auxotróficos de diferentes sorotipos de *Salmonella*, como é o caso de *Salmonella enterica*, sorotipos Typhi ou Typhimurium (CARDENAS e CLEMENTS, 1992), *Shigella flexneri* (NORIEGA *et al.*, 1997) e *Listeria monocytogenes* (JENSEN *et al.*, 1997).

Dependendo do tipo de resposta imune necessária para prevenir a infecção por um patógeno de interesse, vetores de *Salmonella* viva atenuada codificando antígenos protetores heterólogos podem induzir resposta imune relevante, sendo esta humoral, via mucosa ou mediada por células (GALEN e LEVINE, 2001).

Várias mutações podem atenuar vários sorotipos de *Salmonella*, sendo que uma das mais freqüentemente utilizadas é a mutação *aroA*, que anula a habilidade deste microrganismo de sintetizar componentes aromáticos. Dessa forma a bactéria é incapaz de se reproduzir, mas ainda é capaz de invadir o intestino delgado e de persistir aí por um tempo longo o bastante para produzir e secretar concentrações de antígeno suficientes para provocar uma resposta imune efetiva (CARDENAS e CLEMENTS, 1992).

A localização do antígeno na bactéria carregadora e conseqüentemente a apresentação adequada do mesmo ao sistema imune têm importância crucial no acionamento da resposta imunológica desejada. Segundo KAUFMANN e HESS (1999), a secreção do antígeno é uma característica desejável em uma vacina contra bactérias intracelulares.

No intuito de alcançar a expressão estável de antígenos heterólogos, uma das estratégias mais bem sucedidas, tanto para a expressão estável *in vivo* quanto

para a secreção de proteínas recombinantes nestes vetores bacterianos, é o uso do sistema de secreção da α -hemolisina de *E. coli* (HlyA) para a veiculação de antígenos heterólogos em bactérias Gram-negativas com virulência atenuada (DIETRICH *et al.*, 2001; GENTSCHEV, 1996). Este sistema permite a secreção direta da proteína inteira para o meio extracelular, sem a formação de intermediários no espaço periplásmico, por meio de um vetor que é replicado de forma estável em diversas bactérias Gram-negativas, incluindo diferentes sorotipos atenuados de *Salmonella*, *Shigella* spp. e *Vibrio cholerae* (SPRENG *et al.*, 1999).

Com base no sistema de secreção da hemolisina, várias vacinas contra as bactérias intracelulares *Listeria monocytogenes* (HESS *et al.*, 1996), *Mycobacterium tuberculosis* (HESS *et al.*, 2000) e *Clostridium difficile* (RYAN *et al.*, 1997), contra os parasitas *Theileria parva* (GENTSCHEV *et al.*, 1998) e *Plasmodium falciparum* (GÓMEZ-DUARTE *et al.*, 2001) e contra o vírus do sarampo (SPRENG *et al.*, 2000) foram desenvolvidas, totalizando, até o ano de 2002, mais de 400 proteínas híbridas (GENTSCHEV *et al.*, 2002b).

2.4.1 *Salmonella* sp.: aspectos gerais e vetores vacinais

O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* é composta por diversos sorotipos, entre eles o sorotipo Typhimurium. O gênero é caracterizado por bactérias em forma de bacilos, com diâmetro médio entre 0.7 a 1.5 μm e comprimento de 2 a 5 μm , Gram-negativas, não-esporulantes, anaeróbias facultativas, que apresentam motilidade associada à presença de flagelos, e sendo proximamente relacionadas ao gênero *Escherichia*.

O sorotipo Typhi é o causador da febre tifóide em humanos e a linhagem Typhimurium causa diversas infecções em pássaros e mamíferos, e pode causar intoxicação em humanos pelo consumo de alimentos contaminados.

Para o desenvolvimento de vetores vacinais de *Salmonella*, diversas atenuações têm sido estudadas para a geração de linhagens apropriadas, basicamente dos sorotipos Typhi e Typhimurium. Tais atenuações devem reduzir a habilidade do organismo se desenvolver no indivíduo vacinado, e idealmente, a velocidade de crescimento do vetor não deve aumentar significativamente em indivíduos imuno-comprometidos. Por outro lado, atenuações excessivas são

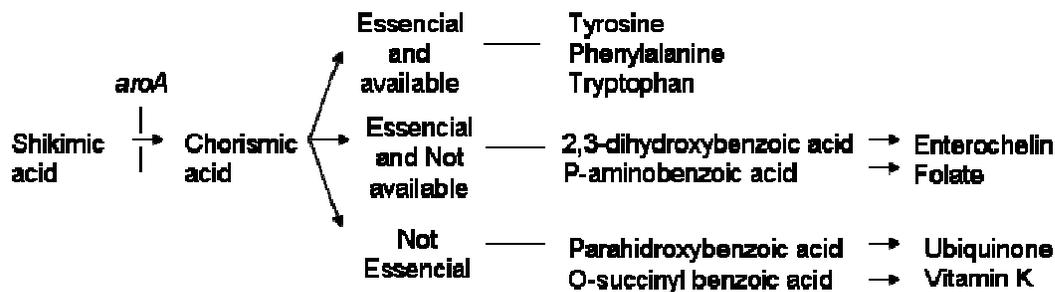
indesejáveis, uma vez que podem comprometer a capacidade da bactéria vacinal de persistir nos tecidos e induzir uma imunidade protetora (MASTROENI *et al*, 2000). O Quadro 2.3 traz exemplos de genes alvo para a criação de linhagens atenuadas de *Salmonella*.

Quadro 2.3 – Genes alvo para criação de linhagens atenuadas de *Salmonella*

Gene alvo da mutação	Função do gene
<i>galE</i>	Conversão de UDP-galactose a UDP-glicose
<i>aro</i>	Biossíntese de PABA, DHB e aminoácidos aromáticos
<i>pur</i>	Biossíntese de adenina
<i>htrA</i>	Proteção contra estresse oxidativo e de alta temperatura
<i>cya/crp</i>	Biossíntese de cAMP e expressão do receptor de AMP
<i>ompR</i>	Regulação da expressão de proteínas de membrana externa e Vi
<i>ompC, ompF</i>	Biossíntese das proteínas C ou F de membrana externa
<i>phoP/phoQ</i>	Regulação de genes de virulência
<i>waaN</i>	Acilação secundária do lipídeo A
<i>recA, recBC</i>	Recombinação e reparo do DNA
<i>guaBA</i>	Biossíntese de nucleotídeos de guanina
<i>nuoG</i>	Expressão de NADH desidrogenase I
<i>surA</i>	Biossíntese de uma peptidilprolil- <i>cis, trans</i> -isomerase
<i>dam</i>	Expressão de DNA adenina metilase

Fonte: Adaptado de MASTROENI *et al.*, (2000).

A linhagem de *S. typhimurium* SL7207 doada pelo Dr. Ivaylo Gentshev (Würzburg Universität - Alemanha) e utilizada neste trabalho, apresenta atenuação no gene *aroA*, que bloqueia a via sintética de compostos aromáticos. A Figura 2.1 mostra a via biossintética interrompida em mutantes *aroA*. São mostradas também as substâncias que estão presentes ou não em tecidos de mamíferos, bem como seu caráter essencial ou não às células do microrganismo.

Figura 2.2 – Via biossintética de compostos aromáticos de *S. typhimurium*.

Fonte: Adaptado de CARDENAS e CLEMENTS (1992).

Como mostrado na Figura 2.1, a mutação no gene *aroA* interrompe a via biossintética de diversos compostos aromáticos nas células de *S. typhimurium*. Os aminoácidos aromáticos podem ser captados dos tecidos do mamífero infectado, e a ubiquinona e a vitamina K não são essenciais para o microrganismo. Entretanto, os ácidos p-aminobenzoico e 2,3-dihidroxibenzoico são dois metabólitos essenciais não encontrados em tecidos de mamíferos. Por isso, mutantes incapazes de sintetizá-los se mostram avirulentos, pois têm seu metabolismo limitado nas células hospedeiras (CARDENAS e CLEMENTS, 1992).

2.4.2 Sistema de secreção da alfa-hemolisina e construção do vetor de expressão e secreção pMOhly1

Algumas linhagens hemolíticas de *E. coli* foram caracterizadas como produtoras de grande quantidade de uma exotoxina, a hemolisina. Essa enzima representa um dos poucos exemplos de proteínas que são exportadas para o meio extracelular por *E. coli*, e o aparato de secreção da hemolisina desta bactéria foi extensivamente estudado nas décadas passadas (WANDERSMAN e DELEPELAIRE, 1990; KENNY *et al.*, 1992; SCHÜLEIN *et al.*, 1992).

Acreditava-se inicialmente que a via de secreção dessa proteína era especificamente adaptada para essa toxina, mas atualmente sabe-se que um grande grupo de toxinas bacterianas produzidas por várias bactérias Gram-negativas, chamadas de toxinas RTX (WELCH, 1991), bem como outras exoenzimas

(especialmente proteases) são todas transportadas através das membranas bacterianas por um mecanismo similar.

O estudo do sistema de transporte da hemolisina para o exterior da célula revelou inicialmente que sua secreção era dependente de dois processos complementares. O primeiro envolvia o transporte da enzima para o espaço periplásmico e era dependente de energia, e a etapa seguinte promovia a secreção da hemolisina acumulada no periplasma para o meio extracelular, por um processo independente de energia (GOEBEL e SPRINGER, 1980).

Foram identificadas ainda, algumas condições do meio de cultura capazes de influenciar na secreção da hemolisina: valores de pH maiores que 8,0 e temperaturas menores que 20°C inibem a secreção, enquanto a adição de hemoglobina no meio de cultivo estimula a produção da enzima. Além disso, foi verificada que a concentração da proteína secretada aumenta até a metade da fase exponencial, e depois tende a diminuir na fase estacionária de crescimento (GOEBEL e SPRINGER, 1980). Mais tarde foi demonstrada que a baixa osmolaridade do meio de cultivo, o crescimento em temperaturas mais elevadas (37°C) e condições de anaerobiose aumentam a produção da hemolisina (MOURIÑO *et al.*, 1994).

Estudos subseqüentes com a linhagem de *E. coli* alfa-hemolítica PM152 identificaram um dos 3 plasmídeos transmissíveis desta cepa, com massa molecular de 41×10^6 , como sendo portador do genótipo hemolítico, e este plasmídeo foi denominado pHly152 (NOEGEL *et al.*, 1981).

A caracterização parcial do plasmídeo pHly152 permitiu descobrir que além do gene da hemolisina (*hlyA*), pelo menos outros 2 genes estavam envolvidos com o processo de transporte e secreção da enzima. Um deles, chamado de *hlyB*, estaria envolvido com a secreção da proteína para o meio extracelular, e o outro, denominado de *hlyC*, seria necessário para o transporte para o periplasma ou para a ativação da hemolisina imatura (GOEBEL e HEDGPETH, 1982). Estudos posteriores (WAGNER *et al.*, 1983) demonstraram que a proteína codificada pelo gene *hlyC* ativava a hemolisina no citoplasma e um sistema de transporte específico que consistia do produto dos genes *hlyB* e *hlyD* efetuava o transporte da forma ativa da hemolisina através das membranas da bactéria. Os genes *hlyA*, *hlyB* e *hlyC* formam uma estrutura de *operon* que é transcrita a partir de um promotor (*phlyI*) localizado na região *upstream* do gene *hlyC*. Já o gene *hlyD*, descrito por WAGNER e

colaboradores (1983) é transcrito independentemente dos demais a partir do promotor *phlyII* (JUAREZ *et al.*, 1984).

Foram descritas ainda, duas outras estruturas importantes para a produção e secreção da hemolisina, presentes no plasmídeo pHly152. A mais importante delas foi chamada de *hlyR*, e se trata de uma seqüência *enhancer* de 600 pb localizada a uma distância superior a 1,5 kb do promotor *phlyI*. Entre o *hlyR* e o promotor *phlyI*, foi encontrada a seqüência de um elemento IS2, que não está envolvido diretamente no mecanismo de aumento da transcrição do cassete da hemolisina (*hlyC*, A e B), mas deve suportar o posicionamento ótimo do *hlyR* em relação ao cassete (VOEGEL *et al.*, 1988).

GONZALES-CARRERO e colaboradores (1985) clonaram um fragmento *Sall* do plasmídeo pHly152 contendo os quatro genes *hly* (A, B, C e D) mais o elemento IS2 e 4 kb *upstream* (região que inclui o *hlyR*) no sítio *Sall* do vetor pBR322 (Figura 2.2a), e a produção da hemolisina foi 20 vezes superior à da linhagem com o plasmídeo parental pHly152. A produção da enzima a partir do plasmídeo recombinante, chamado de pSU157, ocorreu durante todo o cultivo, sendo que na fase exponencial foi detectada a forma ativa da hemolisina e na fase estacionária ocorreu a secreção da proteína na sua forma inativa.

A mesma construção foi feita por outro grupo de pesquisadores e o plasmídeo recombinante foi chamado de pANN202-812 (VOEGEL *et al.*, 1988).

A partir do pANN202-812 foi feita a construção do plasmídeo pMOhly1 (GENTSCHEV *et al.*, 1996), o qual nos foi gentilmente cedido por I. Gentschev (Würzburg Universität, Alemanha) para utilização neste trabalho. Para isso, foi feita a remoção da seqüência entre os sítios de *Clal* na região *upstream* do *hlyR* no pANN202-312, e em seguida foi retirada a seqüência entre os sítios de *Nsil* do gene *hlyA*, como esquematizado na Figura 2.2b.

Figura 2.2a – Representação esquemática do vetor pBR322 usado na construção do plasmídeo pANN202-812 (e conseqüentemente no pMOhly1)

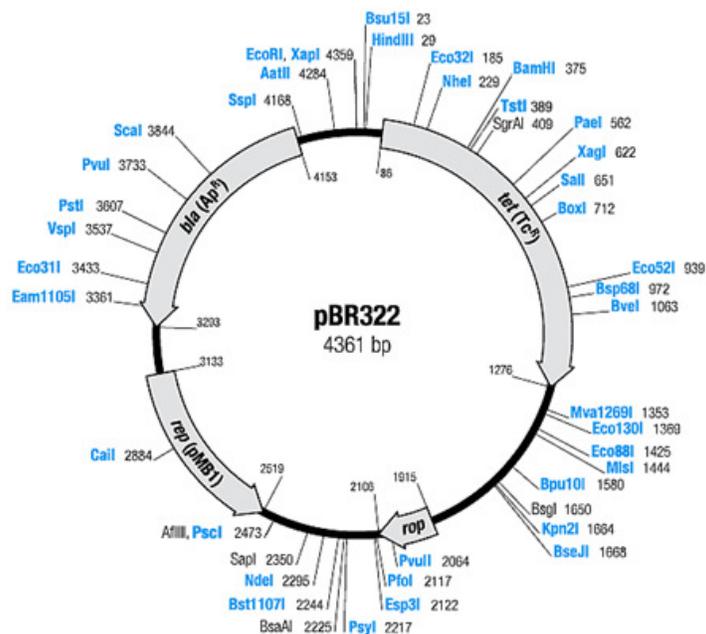
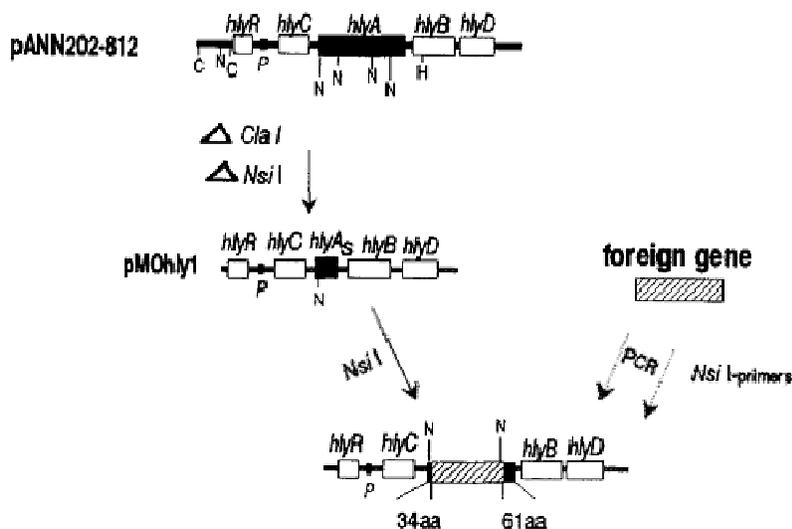


Figura 2.2b – Esquema da construção do vetor pMOhly1 e da clonagem de genes heterólogos neste vetor



C = sítio de *ClaI*; N = sítio de *NsiI*; P = promotor; Δ = deleção do DNA entre os sítios de restrição indicados

Fonte: Elaborado por Gentschev *et al* (1996)

Dessa forma, o plasmídeo pMOhly1 contém os genes estruturais *hlyC*, *hlyB* e *hlyD* intactos e duas seqüência residuais do gene *hlyA*, codificando os 34 aminoácidos N-terminal e os 61 aminoácidos da porção C-terminal da hemolisina, onde está presente a seqüência sinal reconhecida pelo sistema de secreção. Assim, um único sítio *Nsil* localizado entre as porções residuais do gene *hlyA* é utilizado para a inserção de genes de proteínas heterólogas, que dessa forma são produzidas fusionadas ao sinal de secreção da hemolisina e podem ser exportadas para fora da célula hospedeira (*E. coli*, *S. typhimurium*, etc) por esse sistema.

3 MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este tópico está dividido em duas partes, subdivididas em seções, no intuito de apresentar de forma clara e concisa os métodos empregados e os resultados obtidos nas diferentes etapas deste trabalho.

A primeira parte se refere à produção do antígeno rSpaA de *E. rhusiopathiae* em células de *E. coli* com vistas ao desenvolvimento de uma vacina de subunidade composta pelo antígeno recombinante purificado.

Os materiais e métodos e resultados são apresentados e discutidos na forma de 2 artigos científicos submetidos para publicação. O primeiro deles, apresentado na Seção 3.1, trata das etapas de clonagem, expressão e purificação do antígeno rSpaA, e de sua produção em frascos agitados sob a condição de auto-indução. A Seção 3.2 traz o segundo artigo, onde são apresentados os métodos e resultados referentes à produção do antígeno recombinante em cultivos em batelada alimentada empregando estratégias não-convencionais de indução da expressão. Por fim, o Anexo 1 se refere ao acordo firmado com a empresa espanhola Hipra S.A. para envio de uma amostra da proteína rSpaA purificada para testes preliminares, a serem realizados pelo setor de pesquisa e desenvolvimento da referida empresa, sobre a aplicação deste antígeno em kits de diagnóstico para erisipela suína. O Termo de Transferência deste material abre a perspectiva futura de estabelecimento de um Projeto de Extensão entre a empresa e a UFSCar, envolvendo a cessão da *rE. coli* expressando o fragmento de SpaA.

A segunda parte apresenta a clonagem em *S. typhimurium* e caracterização da linhagem vacinal como veículo para expressão *in vivo* do antígeno rSpaA. Esta parte do trabalho é introduzida pela Seção 3.3 que compreende uma mini revisão em fase de finalização para submissão à publicação sobre vetores bacterianos vivos. Na sequência, a Seção 3.4 apresenta os métodos, resultados e discussão da clonagem e caracterização *in vitro* e *in vivo* do vetor bacteriano vivo produzido neste trabalho.

PARTE 1 – Produção do antígeno recombinante SpaA em células de *E. coli* para obtenção de vacina de subunidade a partir da proteína recombinante purificada

Seção 3.1 – Artigo 1: Clonagem, expressão, purificação e produção em frascos agitados do antígeno recombinante rSpaA de *E. rhusiopathiae* em células de *E. coli*

Artigo submetido à Revista *Current Microbiology*, editada por Springer Science+Business Media.

Cloning, expression, purification and auto-induction production of rSpaA swine erysipelas antigen

Adilson José da Silva¹, Mônica Rosas da Costa Iemma¹, Antônio Carlos Luperni Horta¹, Cíntia Regina Sargo¹, Raquel de Lima Camargo Giordano¹, Roberto de Campos Giordano¹, Teresa Cristina Zangirolami¹, Maria Teresa Marques Novo²

¹Chemical Engineering Department, Federal University of São Carlos

²Genetics and Evolution Department, Federal University of São Carlos

Rodovia Washington Luís, km 235; C.P. 676; CEP: 13565-905; São Carlos – SP, Brazil.

ABSTRACT

*This work reports the cloning, expression and purification of a 42 kDa fragment of the SpaA protein from *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the main antigenic candidate for a subunit vaccine against swine erysipelas. It was also investigated the use of auto-induction protocol to improve the heterologous protein expression. The cellular growth pattern and metabolite formation were also evaluated under the different induction conditions employed. The His-tagged protein was over-expressed as inclusion bodies and was purified by a single chromatography step under denaturing conditions. Auto-induction condition showed to be an excellent process strategy leading to high level of rSpaA expression (about 25% of total cellular protein content) in a short period of time.*

Keywords: swine erysipelas, subunit vaccine, auto-induction, recombinant protein, SpaA antigen, *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

INTRODUCTION

Swine erysipelas is a common disease in swine cultures around the world. It causes arthritic lesions and endocarditis problems, which may cause carcasses to be condemned, provoking great economic losses [5].

Nowadays the disease is controlled using cellular vaccines (prepared with killed or attenuated cells of *Erysipelothrix rhusiopathiae*) but it has been reported that animal exposure to whole *E. rhusiopathiae* cells can aggravate arthritic lesions [2, 13]. Besides, the available vaccines are able to prevent the acute but not the chronic form of erysipelas [13]. Taken together, these facts point to the urge of developing new formulations, which should be free of cells and with higher efficiency. For this purpose, subunit vaccines (made from one or more purified antigens) seems to be good candidates, as they can trigger a protective immune response without the need of exposing the immune system to the entire pathogenic agent.

Many efforts have been done for the identification of *E. rhusiopathiae* antigens and several studies report the SpaA protein as able of inducing protection in animals vaccinated with this antigenic protein [3, 9, 14]. From these results it is assumed that SpaA would be a good candidate for a subunit vaccine formulation against swine erysipelas. Actually, the SpaA fragment was reported to protect pigs against challenge with both serotypes 1 and 2, the most important serotypes in the swine industry [3].

Subunit vaccines are usually made using GMO (Genetically Modified Organisms), which make possible the production of great amounts of recombinant antigen while avoiding the cultivation of pathogenic organisms. *E. coli* has been the host of choice for the majority of recombinant proteins produced, and the *lac* promoter has been extensively used to control the heterologous protein expression, with different induction strategies being proposed to improve protein production using this system.

The innovative auto-induction process was proposed by Studier [12] to be used as a simple and reliable induction strategy for recombinant protein production under the *lac* promoter control in shaker flasks *E. coli* cultures. The auto-induction medium is composed by a well balanced mixture of different carbon sources and other important nutrients, allowing cells to grow to high densities while the heterologous protein is expressed in high levels. This medium contains glucose to

allow fast and intense cellular growth in the beginning of the culture while also inhibits expression leakage by catabolic repression. Lactose is also present, and is consumed after glucose depletion, activating the *lac* promoter to induce recombinant protein expression. Besides glucose and lactose, glycerol is also present, and sustains growth along with lactose during the induction phase. Using this formulation, the recombinant protein expression levels were higher than using IPTG as inductor [12].

In this work, the antigenic portion of SpaA protein from *E. rhusiopathiae*, reported to provide protection against swine erysipelas [3], was cloned in *E. coli* cells and its expression was studied using the auto-induction protocol in order to optimize the production of this subunit vaccine candidate against swine erysipelas.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and cloning procedures

Cells of *E. rhusiopathiae* NCTC11002 were cultivated overnight at 37°C in Feist modified medium [10] and 5 mL of culture broth were used for genomic DNA extraction as previously described [5].

Amplification of the 1026 bp fragment coding for the *E. rhusiopathiae* SpaA antigenic region [3] from the genomic DNA was performed using the primers SpaA_For-*Nco*I (5' CATGCCATGGGCTACCAAAGTTTCGAAGC 3') and SpaA_Rev-*Hind*III (5' CCCAAGCCTTATCTTTAGGTTTTTCTT 3'), designed based on DDBJ/EMBL/*GenBank* database sequences (accession number AB019124). The underlined nucleotides in the sense strand indicate the location of a *Nco*I site, while those in the antisense strand indicate the location of a *Hind*III site. The PCR amplification reaction was performed in a final volume of 50 μ L, using 0.5 μ g of *E. rhusiopathiae* chromosomal DNA as the template, 0.2 mM of a dNTP mixture, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 μ M of each primer, 1 unit of *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) and its buffer reaction appropriately diluted. Conditions used for amplification were: initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min and extension at 72°C for 3 min, with a final extension step at 72°C for 10 min. The amplified fragment was purified from the agarose gel and cloned into the cloning vector pGEM-T (Promega), subsequently

transformed in *Escherichia coli* DH5 α competent cells. Recombinant cells were selected in agar plates containing 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin and transformation was confirmed by colony PCR using the primers described above. The insert had its sequence confirmed by the Sanger dideoxy method [8] and was transferred to the expression vector pET28a (Novagen) between *Nco*I and *Hind*III sites. Using this system, a histidine hexamer tag was placed at the C-terminus of the recombinant protein. The construction was used to transform *E. coli* BL21(DE3) cells by heat-shock and was further sequenced in both directions. All procedures were performed according standard protocols [7].

Expression of the recombinant SpaA

Growth, metabolite formation and heterologous protein expression with *E. coli* BL21(DE3) bearing the construction pET28a_ *spaA* were investigated in shake flask cultures under different induction strategies. Experiments were performed with ZYM-5052 auto-induction medium [12] or modified LB medium.

Modified LB medium was composed by the following components (in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 10.0 tryptone, 5.0 yeast extract, 5.0 NaCl, 10.0 glucose, 10.5 K_2HPO_4 and 3.7 MgSO_4 .

ZYM-5052 medium [12] was formulated with the following components (in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 0.5 glucose, 2.0 lactose, 5.0 glycerol, 10.0 tryptone, 5.0 yeast extract, 8.95 Na_2HPO_4 , 3.4 KH_2PO_4 , 0.5 MgSO_4 , 2.67 NH_4Cl , 0.71 Na_2SO_4 and 1x stock metal solution. This metal stock solution (1000x) was composed by 50 mM FeCl_3 , 20 mM CaCl_2 , 10 mM each of MnCl_2 and ZnSO_4 , and 2 mM each of CoCl_2 , CuCl_2 , NiCl_2 , Na_2MoO_4 , Na_2SeO_3 , and H_3BO_3 dissolved in HCl. Kanamycin 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was added at each 4 hours of cultivation.

Four cultures were simultaneously run with different induction protocols, as described in Table 1. Experiments were performed in duplicate.

Table 1 – Shaker flasks experiments description

Condition	Culture medium	Inducer	Induction moment
M1	Modified LB	IPTG	OD _{600 nm} = 5.0
M2	ZYM-5052	Lactose	Auto-induction
M3	ZYM-5052 without lactose	Lactose	OD _{600 nm} = 5.0
M4	ZYM-5052 without lactose	IPTG	OD _{600 nm} = 5.0

The same inoculum was used for all four experiments. It was prepared from a single colony freshly transformed, inoculated in 15 mL of LB medium and incubated overnight at 37°C and 250 rpm.

Previous tests using LB medium and IPTG induction at OD_{600nm} of 0.6 led to growth cessation before reaching OD_{600nm} of 2.5. Because cells can grow much more in ZYM-5052 medium [12], induction was done at OD_{600nm} of 5.0 for conditions M1, M3 and M4. Induction was done at IPTG concentration of 0.25 mM.

Experiments were performed using 1.0 L baffled flasks after transferring 2 mL of inoculum to 100 mL of fresh medium, incubated at 37°C and 250 rpm.

Purification of the recombinant SpaA

The recombinant rSpaA was produced mainly in the form of inclusion bodies, which were solubilized under denaturing conditions, before purification by affinity chromatography. The purification protocol was initiated washing 0.5 g wet cells in 15mL lysis buffer containing Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), sucrose 25 % (w/v) and centrifuging at 5000g, 4°C. After that, the cells were resuspended again in 15 mL lysis buffer and left under gently agitation for 30 min at 4°C. Lysozyme was added to a final concentration of 0,1 % (w/v) and the suspension was incubated for 35 min at 4°C. Cells were disrupted by sonication (VibraCell Sonics, 130 W, 20 kHz, 20% Amplitude, 8 pulses of 1 min with intervals of 30 seconds). Nucleic acids were degraded by adding 50 µg DNase and incubating for 30 min at 4°C. Then, inclusion bodies were recovered by centrifuging at 18000 g for 30 minutes at 4°C. The pellet was resuspended in 15 mL of washing buffer, containing Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), Triton X-100 1.0 % (v/v) and urea 3 M, and left under mild agitation for 1 hour at

room temperature. After this period, the solution was centrifuged again (18000 *g* for 30 minutes at 4°C) and this washing procedure was repeated twice on the remaining pellet. Finally the pelletized material was re-suspended in 4 mL of solubilization buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, guanidine hydrochloride 6 M and DTT 10 mM) and left under gentle agitation for 16 to 20 hours at 4°C [7, 11] with modifications.

The purification of the recombinant protein from the washed inclusion bodies was performed by affinity chromatography using a Ni²⁺ Sepharose column (*Histrap* FF – GE HealthCare) following manufacturer's instructions. Gradient elution was carried out by adding 5 volumes of imidazole at concentrations of 50 mM and 100 mM, and 10 volumes at 500 mM. Collected samples were concentrated by ultrafiltration (Vivaspin 20, 10kDa NMWL, GE HealthCare) and analyzed by SDS-PAGE [4] after guanidine removal by ethanol precipitation [6].

Analytical Methods

Cellular growth was monitored by optical density reading (OD, $\lambda = 600$ nm) of the culture broth and dry cell weight measurements.

Metabolites concentration was measured by HPLC (Waters Co. system) using Aminex HPX-87H column (Bio-Rad) and a 5 mM sulphuric acid solution as mobile phase, at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹. The temperature was 50°C. Organic acids were detected at 210 nm (Waters 486 UV-detector), while glucose and glycerol were measured with a refraction index detector (Waters 410). Glucose was also monitored throughout the cultivation by a glucose oxidase reaction kit (Laborlab, Brazil).

To assess plasmid loss during cultivations, diluted samples of culture broth were initially spread on LB agar plates and incubated for 16 h at 37°C. Seventy five colonies from each sample were simultaneously transferred using sterile toothpicks to new plates with and without kanamycin (30 μ g.mL⁻¹). After incubation, colonies grown at both conditions for each sample were counted for comparison [15].

Protein Analysis

The pellets from 1 mL samples of expression cells were resuspended in NaCl 0.9 % (w/v) solution to an optical density (600 nm) of 3.0. For SDS-PAGE

analysis, the cell suspensions were mixed with 1 volume of sample buffer (Tris 0.125 M, β -mercaptoethanol 10 %, SDS 4 %, glycerol 20 %, bromophenol blue 0.004% and urea 8 M) and heated for 10 minutes at 95 °C. Then 15 % SDS-PAGE was performed with 20 μ L of total protein samples in a Mini Protean 3 Cell (Bio-Rad) run for 70 min at 200 V. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R250 and destained with methanol 10 % and acetic acid 10 %.

The gels were photographed to estimate the protein production using the software ImageJ [1]. BSA samples with known concentration (0.1; 0.2; 0.4; 0.8; 1.0 mg.mL⁻¹) were used as standards to estimate rSpaA concentration on gels.

Anti-rSpaA antibodies preparation

Anti-rSpaA polyclonal antibodies were raised in mouse against His-tagged rSpaA purified protein. One animal was subcutaneously inoculated with 50 μ g of protein mixed with Freund's complete adjuvant. After 45 days, the immunized animal was bled and collected blood was centrifuged for 10 min at 4000 rpm. Supernatant was transferred to another tube and centrifuged for additional 3 minutes. Final supernatant was recovered and sodium azide solution was added to a final concentration of 0.02 %.

Western blot

Proteins from SDS-PAGE gels were transferred to nitrocellulose membranes (HyBond ECL – Amershan Biosciences) at 150 V for 2 hours. The membranes were blocked with PBS-skim milk (5 %) overnight at 4°C. Membranes were washed three times for 5 min each with PBS-0.05 % Tween 20. A Primary mouse antibody anti-rSpaA diluted 1:500 in PBS buffer or the mouse anti-HisTag antibody (Cell Signaling) diluted 1:10000 in PBS was applied to the membrane and incubated for 2 hours at room temperature with mild agitation. Membranes were washed as described above and incubated with anti-mouse IgG – AP linked antibody (Cell Signaling) diluted 1:3000 in PBS for 1.5 hours. After washing, membranes were revealed with AP Conjugate Substrate kit (Bio-Rad).

RESULTS AND DISCUSSION

Partial ORF cloning, heterologous expression and purification of antigenic SpaA fragment from *E. rhusiopathiae* NCTC11002

The *spaA* gene fragment was successfully amplified from the genomic DNA of *E. rhusiopathiae* NCTC11002, as can be seen in Figure 1.

The 1026 pb fragment amplified contains the region coding for the antigenic portion of SpaA antigen [3, 9]. DNA sequencing showed that this amplified fragment from NCTC110002 strain had high level of identity with the correspondent sequence from the Fujisawa strain, available on databases. It is in agreement with previous reports that have shown that the *spaA* gene sequence is well conserved among many *E. rhusiopathiae* strains [3].

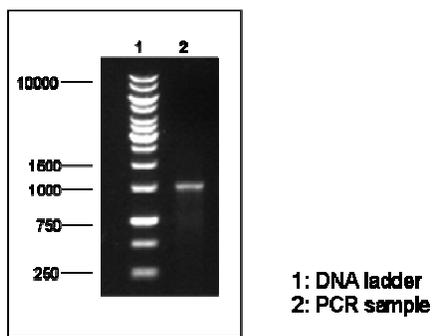


Figure 1 – PCR amplification of *spaA* fragment from *E. rhusiopathiae* NCTC11002 genomic DNA

The recombinant protein was over-expressed under *lacUV5* promoter control using the pET system and IPTG or lactose as inducer. The main fraction of rSpaA produced was found as insoluble aggregates in *E. coli* cytoplasm, and its purification was done under denaturing conditions.

After inclusion bodies solubilization using guanidine hydrochloride as denaturing agent, the rSpaA protein was purified through a single affinity chromatographic step with a Ni-Sepharose column. High purity grade was achieved by imidazole gradient elution, as shown in Figure 2.

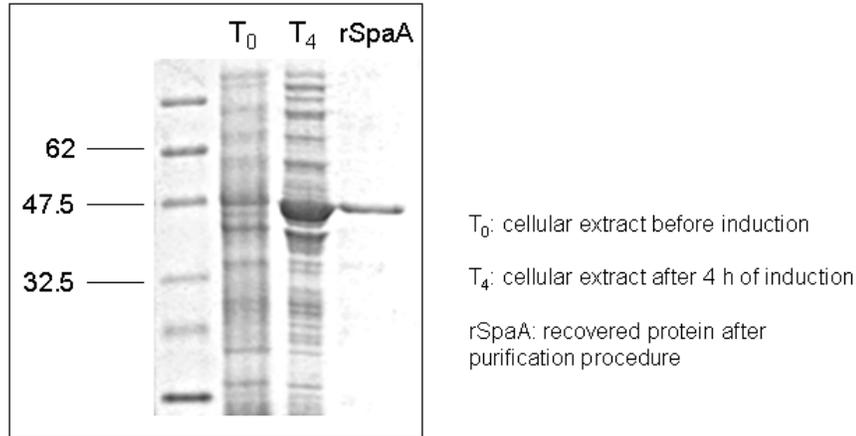


Figure 2 – SDS-PAGE of samples before and after rSpaA purification

The recombinant protein had its molecular weight predicted to be around 42 kDa. Its identity was further confirmed by Western blot analysis. The rSpaA showed positive reaction with mouse anti-HisTag antibodies and with mouse anti-rSpaA antibodies (Fig. 3), confirming its identity as expected.

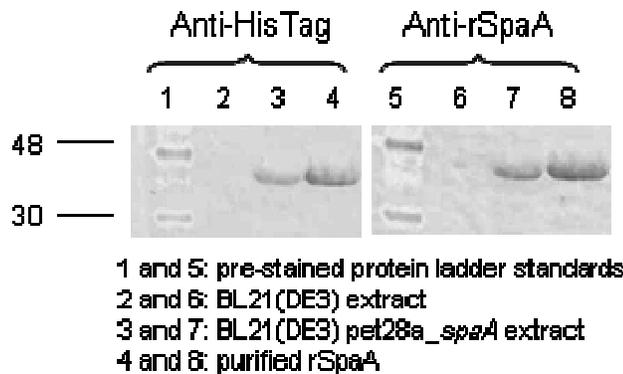


Figure 3 – Western blot analysis with anti-HisTag and anti-rSpaA antibodies of culture extracts of transformed and non-transformed BL21(DE3) cells.

Growth, metabolite formation and protein production under auto-induction condition

Data collected from flasks cultures pointed out for different biomass and heterologous protein production levels accordingly to the process strategy chosen.

Main results of cellular growth and metabolite formation are shown in Figure 4.

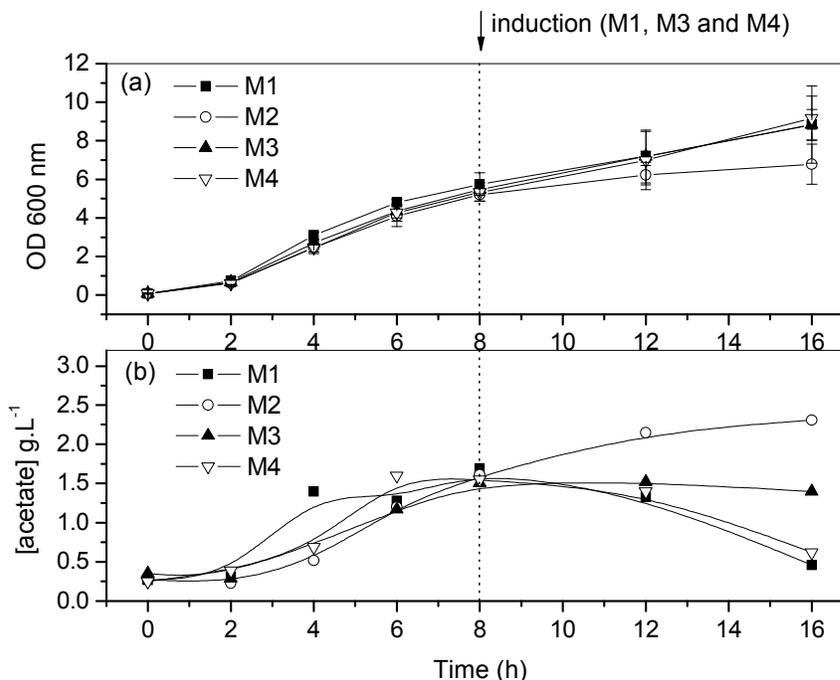


Figure 4 – Growth profile and acetate formation for shaker flasks experiments using different medium and induction conditions. Error bars represent mean deviations from duplicate experiments.

Similar growth profiles were observed for conditions (M1), (M3) and (M4), which were induced by adding IPTG or lactose after they reached an optical density around 5.0 (Figure 4a). Cellular growth continued after induction for these conditions, as cells were not exposed to a prolonged induction regimen. Initial carbon sources were exhausted between 8 and 12 hours of cultivations for all experiments (data not shown), but for conditions (M1) and (M4), previously accumulated acetate was consumed to sustain biomass formation until the end of the process. For condition (M3), lactose added to promote induction ($t = 8$ h) was able to sustain cellular growth, and acetate formed in the early hours remained in the cultivation medium (Figure 4b). In the auto-induction experiment (M2), biomass formation was affected by the early induction imposed to cells. Such a prolonged stress condition caused slower growth with increasing amounts of acetate being formed throughout the cultivation. On the

other hand, as can be seen in Table 2, protein production in the auto-induction experiment (M2) was not severely affected by the acetate accumulated and a maximum specific production of $171 \text{ mg}_{\text{prot-g}} \text{ DCW}^{-1}$ was reached in a short period of time (8 hours of cultivation – the initial moment of induction for the other conditions).

Table 2 – rSpaA specific production and mean deviation using different medium and induction conditions.

Cultivation time (h)	[rSpaA] $\text{mg}_{\text{prot-g}} \text{ DCW}^{-1}$ (protein specific production)			
	M1	M2	M3	M4
8	25 ± 1	171 ± 7	65 ± 3	40 ± 2
12	97 ± 4	143 ± 6	104 ± 4	101 ± 4
16	117 ± 5	165 ± 7	161 ± 7	147 ± 6

The results of the shake flask experiments also showed that conditions where lactose was used as inducer (M2 and M3) produced relatively more rSpaA than those with IPTG addition.

Figure 5 brings the recombinant protein production profile along time for the different strategies studied.

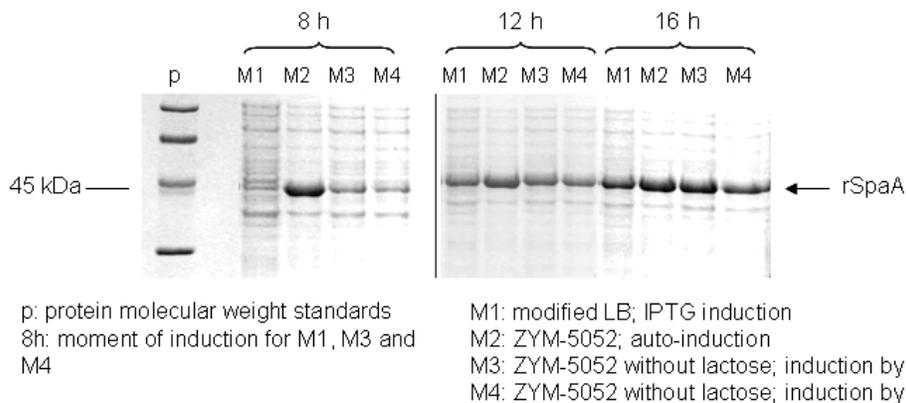


Figure 5 – SDS-PAGE analysis of rSpaA production under different induction conditions

The rSpaA protein was already produced in the auto-induction condition (M2) before 8 hours of cultivation, as can be seen in Figure 5. Similar rSpaA specific production were reached at the end of cultivations for conditions where the ZYM-

5052 medium was employed (M2, M3 and M4), and the highest protein specific production values were achieved in those where lactose was used to induce protein expression (M2 and M3). Between M2 and M3 conditions, the auto-induction strategy (M2) presents the advantage of faster protein accumulation, shortening the cultivation process. Comparing conditions where IPTG was employed as inducer (M1 and M4), the lower rSpaA production in M1 experiments indicates that the well balanced ZYM-5052 medium is superior to the modified LB medium to achieve higher heterologous protein expression.

The auto-induction condition resulted in a high productive process: rSpaA production reached the highest specific production among the conditions evaluated and its expression occurred simultaneously to cell growth. By this approach, within only 8 hours of cultivation, cellular concentration reached an OD of 5.0 and protein specific production of 171 mg_{prot}/g_{DCW}, corresponding to around 25 % of total cellular protein content. On the other hand, conditions M3 and M4 provided better volumetric productivities, as final cellular concentrations were higher in these experiments than for the auto-induction process. Taken together, these results indicate that, among conditions studied here, the optimum rSpaA production process could be achieved by the auto-induction strategy (M2) lasting about 8 h, which would yield a high protein specific production without compromising the volumetric productivity.

Additionally, an efficient purification protocol for this antigen candidate was established through a single chromatographic step under denaturing conditions. These results may be useful for the development of a production process of rSpaA as a potential candidate antigen for a subunit vaccine against swine erysipelas.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support from FAPESP and CNPq. We also thank Amadeus Azevedo for technical assistance and Prof. Dr. Heloísa S. Selistre de Araújo, who kindly help us during antibodies preparation.

REFERENCES

- [1] Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int* 11:36-42

[2] Freeman, MJ (1964) Effects of vaccination on the development of arthritis in swine with erysipelas: clinical, hematological, and gross pathological observations. *Am J Vet Res* 27:597-606

[3] Imada Y, Goji N, Ishiwaka H et al (1999) Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. *Infect Immun* 67:4376-4382

[4] Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

[5] Makino SI, Okada Y, Maruyama T et al (1994) Direct and Rapid Detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in Animals by PCR. *J Clin Microbiol* 32:1526-1531

[6] Pepinsky RB (1991) Selective precipitation of proteins from guanidine hydrochloride-containing solutions with ethanol. *Anal Biochem* 195:177-181

[7] Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edn. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press

[8] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74:5463-5467

[9] Shimoji Y, Mori Y, Fischetti VA (1999) Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the region responsible for protective immunity. *Infect Immun* 67:1646-1651

[10] Silva AJ, Baptista-Neto A, Cilento MC et al (2008) Bioreactor aeration conditions modulate growth and antigen expression during *Erysipelothrix rhusiopathiae* cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:23-31

[11] Simpson RJ (2003) *Proteins and Proteomics: a Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 119-123

- [12] Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high-density shaking culture. *Protein Express Purif* 41:207-234
- [13] Wood RL (1992) Erysipelas. In: Leman AD et al (eds) *Disease of swine*, Iowa, Iowa State University Press, pp 475-486
- [14] Yamazaki Y, Sato H, Sakakura H et al (1999) Protective activity of the purified protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in pigs. *J Vet Med B* 46:47-55
- [15] Zhang Y, Taiming L, Liu J (2003) Low temperature and glucose enhanced T7 RNA polymerase-based plasmid stability for increasing expression of glucagon-like peptide-2 in *Escherichia coli*. *Protein Express Purif* 29:132-139

Seção 3.2 – Artigo 2: Produção do antígeno recombinante rSpaA de *E. rhusiopathiae* em cultivos de *E. coli* de alta densidade celular em biorreator

Artigo submetido à Revista *Microbial Cell Factories*, editada por BioMed Central – part of Springer Science+Business Media.

Non-conventional induction strategies for production of subunit swine erysipelas vaccine antigen in *rE. coli* fed batch cultures

Adilson José da Silva¹, Antônio Carlos Luperni Horta¹, Ana Maria Velez Escalón, Mônica Rosas da Costa Iemma¹, Cíntia Regina Sargo¹, Raquel de Lima Camargo Giordano¹, Maria Teresa Marques Novo², Roberto de Campos Giordano¹, Teresa Cristina Zangirolami¹

¹Chemical Engineering Department, Federal University of São Carlos

²Genetics and Evolution Department, Federal University of São Carlos

Rodovia Washington Luís, km 235; C.P. 676; CEP: 13565-905; São Carlos – SP, Brazil.

ABSTRACT

Background:

Fed-batch cultivation of *E. coli* is the most studied process to produce large amounts of recombinant proteins of interest, including subunit vaccine prototypes. In spite of the large number of reports on this issue, alternative cultivation/induction strategies remain to be more deeply exploited. Among these strategies, it could be mentioned the use of complex media with combination of different carbon sources, novel induction procedures and feed flow rate control matching the actual cell growth rate. Here, the classical glucose-limited fed-batch culture followed by IPTG induction was compared to alternative induction strategies, including an auto-induction protocol, the continuous feeding of lactose during the fed-batch phase and a lactose pulse after growth on glucose plus glycerol.

Results:

Four different carbon source combinations (glucose, glycerol, glucose+glycerol and auto-induction) in batch media formulation were compared. A balanced combination of glucose and glycerol in a complex medium formulation led to: fast growth in the batch-phase; reduced plasmid instability by preventing early expression leakage; and protein volumetric productivity of $0.40 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ at the end of the process. Alternative induction strategies were also investigated. A mixture of lactose and glycerol as supplementary medium fully induced a high biomass population, reaching a good balance between protein specific production ($0.148 \text{ g}_{\text{prot}}.\text{g}_{\text{DCW}}^{-1}$) and volumetric productivity ($0.32 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). An automated feed control based on the on-line estimated growth rate was implemented, which allowed cells to grow at higher rates than those generally used to avoid metabolic overflow, without leading to acetate accumulation.

Conclusions:

Some of the protocols described here may provide a useful alternative to standard cultivation and recombinant protein production processes, depending on the performance index that is expected to be optimized. The auto-induction protocol showed excellent results on protein specific production in simple batch cultivations. Protein volumetric productivity in fed-batch mode was further increased by improving the batch phase medium and the feeding control. The alternative induction strategies based on continuous feeding of lactose and glycerol showed to be superior the usual induction by adding a lactose pulse.

These optimized cultivation and induction protocols for complex media led to rSpaA production in the range of 6 g.L^{-1} at the end of the process, in short fed-batch processes (16 h) with no accumulation of undesired side metabolites.

1. BACKGROUND

Swine erysipelas causes great economic losses in swine culture worldwide, and has been controlled by the use of live attenuated or inactivated vaccines (Wood, 1992). These formulations offer good levels of protection but can aggravate arthritic problems (Freeman, 1964; Wood, 1992). The surface protein A (SpaA) from *Erysipelothrix rhusiopathiae* is the most studied antigen from this pathogenic bacteria and has shown promising results as a candidate to be used in a subunit vaccine against swine erysipelas (Imada *et al.*, 1999; Kitajima *et al.*, 2000), replacing the cellular vaccines in use.

The production of recombinant antigenic proteins for subunit formulations is among the technologies proposed for the next generation of vaccines (Liljeqvist and Stahl, 1999). In case of bacterial antigens, prokaryotic expression systems, such as the *E. coli* bacterium, are the most popular choice due the low costs of production, high productivities of heterologous protein and availability of many genetic tools (Demain and Vaishnav, 2009).

High cell density cultivations (HCDC) employing bioreactors operating in fed-batch mode are among the main methodologies in use for heterologous protein production in recombinant *E. coli* cultures (Shiloach and Fass, 2005). High recombinant protein productivities are in general directly related to the high cellular concentrations reached by this kind of process. Although HCDC of *E. coli* for recombinant protein production has been extensively investigated, innovative modifications can still be implemented aiming at the improvement of the global process, or at the optimization of a specific performance index. Induction strategy, feeding control and media formulation are among the main process conditions eligible to be further improved. Besides that, many reports point out for the need to study case by case all these process variables in order to identify the best operation conditions to produce a specific protein.

Induction conditions for proteins under the *lac* promoter control have been largely studied but, in spite of that, just a few new alternative induction strategies have been proposed, such as the so called “auto-induction” (Studier, 2005) and the “continuous lactose induction strategy” (Lim *et al.*, 2004).

Concerning media formulation, although the majority of reports rely on defined media using glucose or glycerol as carbon sources (Shojaosadati *et al.*,

2008), this work shows that balanced mixtures of both can also be used to speed up growth with negligible acetate accumulation, or complex media formulations with glycerol as the main carbon source can also be employed with excellent results.

Regarding the control of supplementary feed flow rate in the fed-batch phase, the conventional strategy manipulates the input of nutrients so that the specific growth rate would not exceed a pre-selected, heuristic, critical value (μ_{critic}), to prevent toxic by-products formation. In this work the exponential feeding flow was tuned using actual rates estimated on-line during the cultivation by a capacitance probe. Since glycerol did not trigger acetate accumulation under aerobic conditions (Tripathi *et al.*, 2008), we assumed that the feed of supplementary medium should be limited by the actual growth rates, which reflect the dynamics of the cell metabolic state, rather than by a rule of thumb concerning maximum allowable values for μ .

Protein synthesis is also influenced by the chosen cultivation conditions. Usually, defined media and limited growth rates are employed during induction phase (Lee, 1996; Korz *et al.*, 1995), which may hamper protein production. However, when cells are in a rich nutritional condition they increase their ribosome content in order to grow faster. Indeed, a linear correlation between cellular ribosome content and growth rate was reported elsewhere (Keener and Nomura, 1999). Complex medium and a high growth rate (not limited by a pre-set value during fed-batch operation) probably favor the increase of ribosomal content, which may also improve the productivity of the desired recombinant biomolecule.

In summary, this work presents studies of different cultivation and induction strategies for the production of a recombinant fragment (45 kDa) of the N-portion of SpaA, whose antigenic potential has already been demonstrated in swine vaccination tests reported by Imada *et al.* (1999). Gene fragment coding for rSpaA was cloned under the *lacUV5* promoter. The performance of the conventional bioreactor operation protocol, comprising high biomass accumulation prior to induction of expression by a pulse of lactose or IPTG, was compared with alternative protocols using real-time updated exponential feeding profiles of two supplementary media: a glycerol-based complex medium containing lactose, and the auto-induction medium.

2. MATERIALS AND METHODS

Experiments were carried out with *E. coli* BL21(DE3) cells producing a recombinant fragment of the SpaA protein from *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Cloning procedures were done according to standard protocols (Sambrook and Russell, 2001). Briefly, the 1026 pb fragment codifying for the antigenic region of the SpaA protein (Imada et al, 1999) was amplified by PCR from the *E. rhusiopathiae* chromosomal DNA and cloned into pGEM-T vector (Promega). After sequencing, the *spaA* fragment was cloned into the expression vector pET28a (Novagen) and used to transform *E. coli* BL21(DE3) cells.

Four bioreactor cultivations were conducted under conditions described as follows. Media compositions are in Tables 1 and 2.

Experiment #1: the conventional process strategy was used in this cultivation. A modified LB medium containing glucose as carbon source was used in both batch and fed-batch phases. An exponential feeding profile was set by Eq. 1-2, assuming a constant $\mu_{SET} = \mu_{crit}$. Induction was carried out by adding a pulse of IPTG, for a final concentration of 0.25 mM in the medium. Two hours after the moment of induction, the feeding profile was changed to a constant flow rate, in order to avoid substrate accumulation.

Experiment #2: the auto-induction strategy was employed in this cultivation. Here, induction occurs naturally after glucose exhaustion, as the cells start consuming the lactose present in the medium. The supplementary medium, containing glycerol and lactose as carbon sources was supplied at an exponential feeding flow rate (Eq. 1-2), assuming a constant $\mu_{SET} = \mu_{crit}$.

Experiment #3: Glycerol was used as sole carbon source during the batch phase. Induction was done along with feed supply, using a feeding medium containing glycerol plus lactose. By this protocol, heterologous protein expression was induced gradually as the supplementary medium was added to the bioreactor. An exponential feeding flow rate was employed based on the actual growth rates of the bacterium to reset both feed control parameters (C_1 and C_2 in Equation 1).

Experiment #4: the batch medium was prepared using a combination of glycerol and glucose. Fed batch was carried out exclusively with glycerol as carbon source, using an exponential feeding, again based on the actual growth rates as implemented at Experiment #3 (C_1 and C_2 automatically update in Eq. 1-2). Induction was done by a

single addition of 400 mL of induction medium containing lactose, after a high biomass concentration was reached.

Table 1 – Media composition used for bioreactor cultivations

Nutrient (g.L ⁻¹)	Experiment #1		Experiment #2		Experiment #3		Experiment #4		
	Batch	Fed-batch	Batch	Fed-batch	Batch	Fed-batch	Batch	Fed-batch	Induction
Glucose	10	240.0	8.0	---	---	---	10.0	---	---
Glycerol	---	---	10.0	400.0	40.0	400.0	60.0	400.0	---
Lactose	---	---	2.0	160.0	---	80.0	---	---	20*
Tryptone	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Yeast extract	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
NaCl	5.0	5.0	---	---	---	---	---	---	---
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.5	20.0	0.5	40.0	0.5	40.0	0.5	40.0	0.5
K ₂ HPO ₄	7.0	7.0	---	---	---	---	---	---	---
KH ₂ PO ₄	---	---	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	---	---	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
NH ₄ Cl	---	---	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
Na ₂ SO ₄	---	---	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
kanamycin (μg.mL ⁻¹)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antifoam PPG 30 % (mL.L ⁻¹)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Metal solution	no	no	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes

* final concentration in the bioreactor

Table 2 – Metal solution composition

Component	Batch and induction medium (mg.L ⁻¹)	Fed-batch medium (mg.L ⁻¹)
Ferric citrate	100.8	40.0
CoCl ₂ .6H ₂ O	2.5	4.0
MnCl ₂ .4H ₂ O	15.0	23.5
CuCl ₂ .2H ₂ O	1.5	2.3
H ₃ BO ₃	3.0	4.7
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2.1	4.0
Zn(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	33.8	16.0
EDTA	14.1	13.0

Inocula were prepared picking up cells from a glycerol stock suspension. The cells were aseptically transferred to the culture medium. Overnight incubation in a rotary shaker was done at 37°C, 250 rpm using the medium of the batch phase of each experiment, with a volume corresponding to 10% of the bioreactor cultivation volume. For the auto-induction strategy (Experiment #2) the inoculum medium was prepared with 0.5 g.L⁻¹ glucose and 5.0 g.L⁻¹ glycerol, but without lactose.

Experiments were carried out in a 6.0 L bioreactor (*in-house made* – Experiments #2-4), connected to a gas analyzer (Sick/Maihak S710). Two mass flow

controllers (GFC Aalborg, USA) were employed to supply air and/or oxygen, keeping dissolved O₂ concentration at 30% of saturation (O₂ sensor Mettler Toledo, model Inpro 6800) by changing the agitation speed (between 100 and 900 rpm) and enriching air with oxygen when the maximum agitation was reached. The total gas flow rate was restricted between 1 and 2 VVM. pH was controlled at 7.0 ± 0.2 by adding NH₄OH 25% (v/v) and H₃PO₄ 10% (v/v). All experiments were conducted at 37 ± 0.5 °C (growth and induction phases) by controlling the temperature of the water re-circulating in bioreactor jacket. A capacitance probe (Biomass System - Fogale Nanotech) was used for on-line monitoring of biomass formation. The permittivity data collected from the capacitance probe was smoothed by the classical moving average filter (Eilers, 2003). The filter used had a size vector of 80 rough data. Online data were used to estimate cell growth rate. The supervisory system SuperSys_HCDC^R (Horta *et al.*, 2011), based on LabView (National Instruments), was used to monitor and control the experimental apparatus.

The exponential feeding flow rate for all experiments was calculated by equation 1, which assumes that the specific growth rate depends only on the limiting substrate (in this case, the carbon sources) concentration (Nielsen *et al.*, 2002). The supervisory system controlled the feed, using a peristaltic pump (Ismatec - model BVP).

$$F = C_1 \cdot e^{(C_2 t)} \quad (1)$$

$$C_1 = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m \right) \cdot \frac{C_{X0} \cdot V_0}{C_{S0} - C_{SR}} \quad (2)$$

C_{X0} and V_0 are cellular concentration and volume, respectively, which were updated at every 10 min, $Y_{X/S}$ is the biomass yield, m the maintenance coefficient (both assumed equal to 0.6 g_{DCW}·g_{substrate}⁻¹ and 0.025 h⁻¹, respectively), while C_{S0} is the carbon source concentration in the supplementary medium (Table 1), and C_{SR} the expected residual concentration of the carbon source in the reactor (assumed as 5 g·L⁻¹). When more than one sugar was present in the medium, lactose and/or glucose and/or glycerol were pooled together as one limiting substrate. In Experiments #1-2, the tuning parameters C_1 and C_2 were kept constant during all the

growth phase, with $C_2 = \mu_{SET} = 0.13 \text{ h}^{-1}$ (the “critical” specific growth rate, μ_{crit}) in Equation 1 and $\mu = \mu_{SET} = 0.13 \text{ h}^{-1}$ in Equation 2 (the “classical” approach).

In Experiments #3 and #4, both C_1 and C_2 were continuously retuned at each 10 min using the values of μ , obtained online from the permittivity measurements provided by the capacitance biomass sensor (Horta *et al.*, 2011). Thus, for Experiment #3 and #4, Equations 1-2 are no more based on a phenomenological reasoning that imposes a fixed value for μ . Instead, Equations 1-2 must be faced as empirical, open loop control laws.

Analytical Methods

Cellular growth: culture broth optical density reading (OD, $\lambda = 600 \text{ nm}$), dry cell weight measurements ($\text{g}_{DCW} \cdot \text{L}^{-1}$), counting $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ and on-line estimation by measuring broth permittivity ($\text{pF} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Metabolites concentrations: HPLC (Waters Co. system) using Aminex HPX-87H column (Bio-Rad) at 50°C , 5.0 mM sulphuric acid solution as mobile phase, at a flow rate of $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Organic acids were detected at 210 nm (Waters 486 UV-detector), while glycerol, glucose and lactose were measured with a refraction index detector (Waters 410). Glucose and glycerol were also monitored throughout the fermentation by a glucose oxidase reaction kit (Laborlab) and a triglycerides determination kit (Laborlab), respectively. Protein expression was checked by SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and the gels were photographed to estimate the protein production using the software ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004). BSA samples with known concentration were used as standards to estimate rSpaA concentration on gels.

To assess plasmid loss during the cultivations, diluted samples of culture broth were initially spread on LB agar plates and incubated for 16 h at 37°C . Seventy five colonies from each sample were simultaneously transferred using sterile toothpicks to new plates with and without kanamycin ($30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). After incubation, colonies grown at both conditions for each sample were counted for comparison (Zhang *et al.*, 2003).

3. RESULTS AND DISCUSSION

SUBSTRATE UPTAKE, BIOMASS FORMATION AND METABOLITE ACCUMULATION

Experiment#1, was carried out following a classical strategy: fast and intense cellular growth on glucose as sole carbon source (modified LB medium) during batch and feeding phases, and induction with IPTG (0.25 mM final concentration) at the end of the exponential growth, for a period of 4 hours. A maximum biomass concentration of $22 \text{ g}_{\text{DCW}}\cdot\text{L}^{-1}$ was achieved starting the batch phase with $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of glucose. The controlled addition of supplementary feed, together with good aeration conditions, prevented accumulation of by-products at the end of the process (Figure 1). Acetic and formic acids formed during the batch phase were consumed in the period between glucose exhaustion (after 3h) and feeding start up (beginning at 4.2 h), and were not present in significant amounts (maximum concentration below $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) during the induction phase. Permittivity data followed closely the trends of biomass formation, but with drastic slope changes that marked the beginning and end of cell growth on acetate. It should be noticed, however, that the decrease in permittivity between 3.5 and 4.5 h (i.e., a strong decrease in viable cell mass) was a trend not followed by the measurements of DCW and OD.

The capacitance probe measures the dielectric permittivity of cell suspensions, which is related not only to biomass concentration, but also to the cell structure as well as to its morphological and physiological states (Matangiham *et al.*, 1994). A relationship between capacitance and cell viability has also been suggested (Matangiham *et al.*, 1994; Asami, 2002).

A maximum specific growth rate of 1.1 h^{-1} was registered, even in the presence of acetic and formic acids. Biomass yield coefficient was around $0.6 \text{ g}_{\text{DCW}}\cdot\text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ during the batch phase (Table 3).

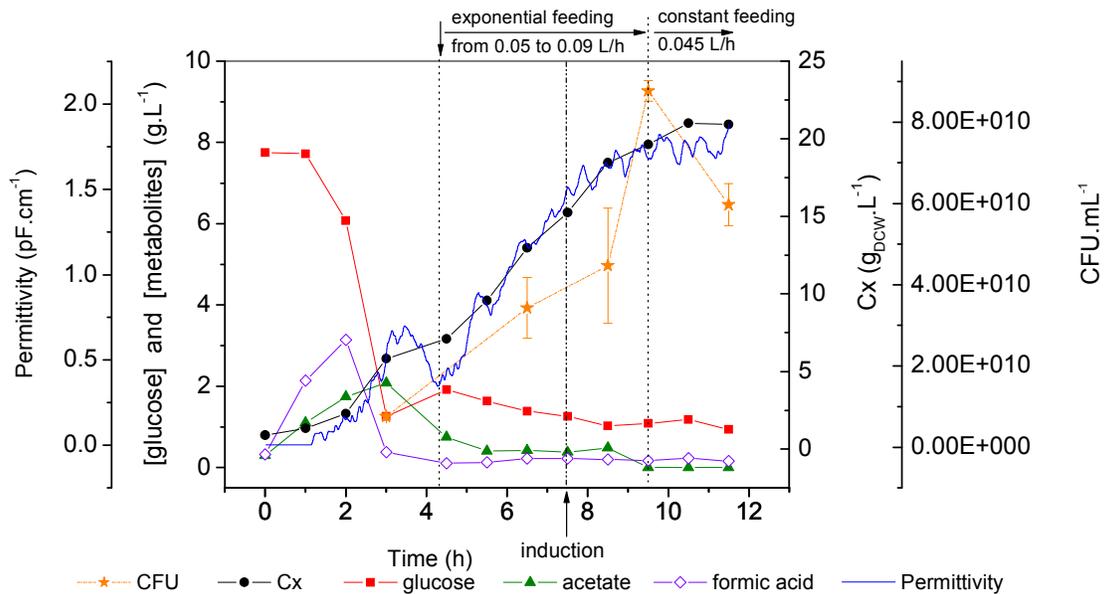


Figure 1 – Cell growth, substrate consumption and metabolites formation during Experiment #1. Error bars in CFU are standard deviations from triplicates. Batch and fed-batch using glucose as main carbon source, and IPTG induction.

The auto-induction strategy was tested in Experiment #2. This protocol, originally proposed for flask cultures by Studier (2005), is based on a balanced nutrient medium containing three main carbon sources: glucose, glycerol and lactose. Glucose is preferentially assimilated, and enables intense cell growth at the beginning of the cultivation. By this way, a considerable amount of biomass can be accumulated before induction. After glucose exhaustion, lactose starts to be consumed and expression of the recombinant protein is initiated. In this phase, glycerol is consumed along with lactose, working as an extra energy source to sustain cellular growth (Studier, 2005).

Figure 2 shows its main results. Consumed glucose in batch phase resulted in biomass accumulation in a short period of time. Glycerol and lactose were assimilated simultaneously, resulting in glycerol accumulation from the mid fed-batch phase on, due to the high glycerol and lactose concentrations present in the supplementary feed. There was no formic acid formation as observed in the cultivation with glucose as the sole carbon source (Experiment #1). But, acetate formation was observed throughout the cultivation. Together with metabolic stress associated to protein over expression, acetate probably affected cellular viability.

Maximum specific growth rate was 0.80 h^{-1} , and biomass yield coefficient was $0.57 \text{ g}_{\text{DCW}} \cdot \text{g}_{\text{substrate}}^{-1}$, both a little lower than with glucose (Experiment #1), as expected (Table 3).

Permittivity data detected the drop in cellular viability from the mid fed-batch phase on, as also shown by CFU counting. Such a reduction cannot be observed in the dry cell weight data as this method does not distinguish between viable and non-viable cells.

From the growth profile depicted at Figure 2, it seems that the anticipated expression overloaded cellular metabolism and affected cell division, despite the abundance of nutrients. It caused glycerol accumulation and low biomass formation. However, lactose remained intensely consumed until the end of cultivation.

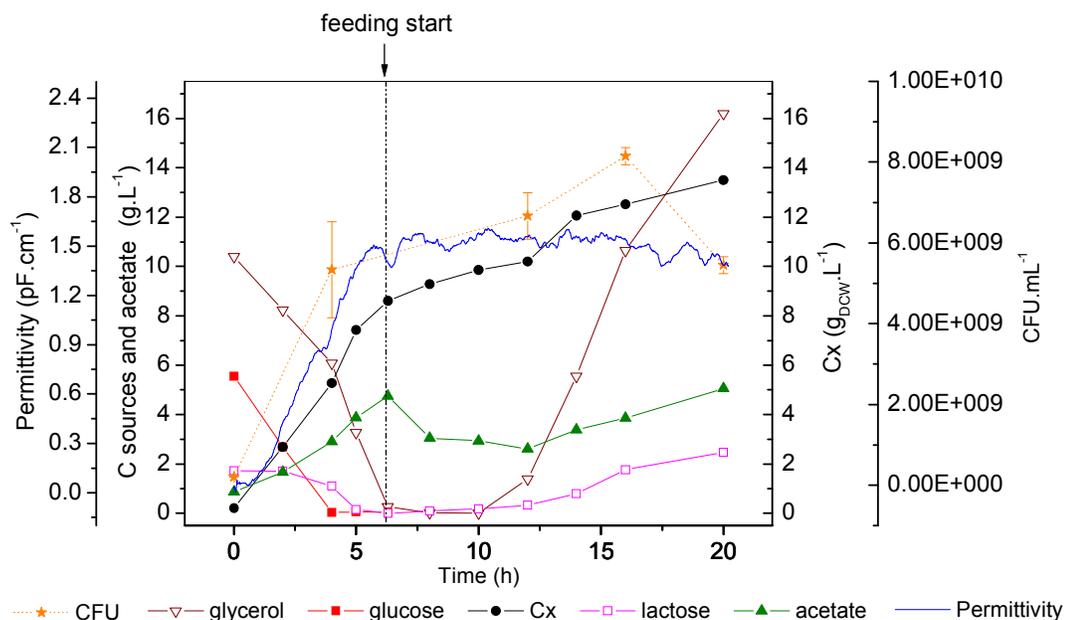


Figure 2 – Cellular growth, substrate consumption and metabolites formation during Experiment #2. Auto-induction protocol using glucose, glycerol and lactose as carbon sources in batch phase. Feeding stage with glycerol and lactose. Error bars in CFU are standard deviations from triplicates.

Glycerol was used as sole carbon source in the batch medium for Experiment #3. An alternative induction strategy was also studied here, where the feeding medium was prepared with a combination of glycerol and lactose to promote rSpaA expression and sustain growth at the same time.

As it has been reported in the literature, *E. coli* cells grow slower on glycerol than on glucose due to differences in the substrate assimilation mechanisms (Korz *et al.*, 1995; Lee, 1996). But, on the other hand, growth on glycerol leads to lower toxic byproducts formation as this lower assimilation rate does not cause metabolic overflows (Lee, 1996; Tripathi *et al.*, 2008). Figure 3 shows the main results of Experiment #3.

Permittivity data followed quite well the trends of biomass formation during the first 10 h of cultivation. However, when the fed-batch and induction phase started, a bias in the biomass concentration profiles estimated by the capacitance probe with respect to DCW is observed. This could be attributed to the increased metabolic activity during protein expression, captured by the capacitance probe. CFU measurements at ~15 h of cultivation (5 h of induction) showed an opposite trend in comparison to both DCW experimental points and permittivity data. Here a discussion of how to assess cell density in the absence of other techniques such fluorescence flow cytometry and real time PCR arises. CFU accounts for viability of cells taken off the bioreactor environment, DCW may be biased by non-viable cells and capacitance may be affected by changes in the dielectric properties of cells where a great accumulation of heterologous protein occurs.

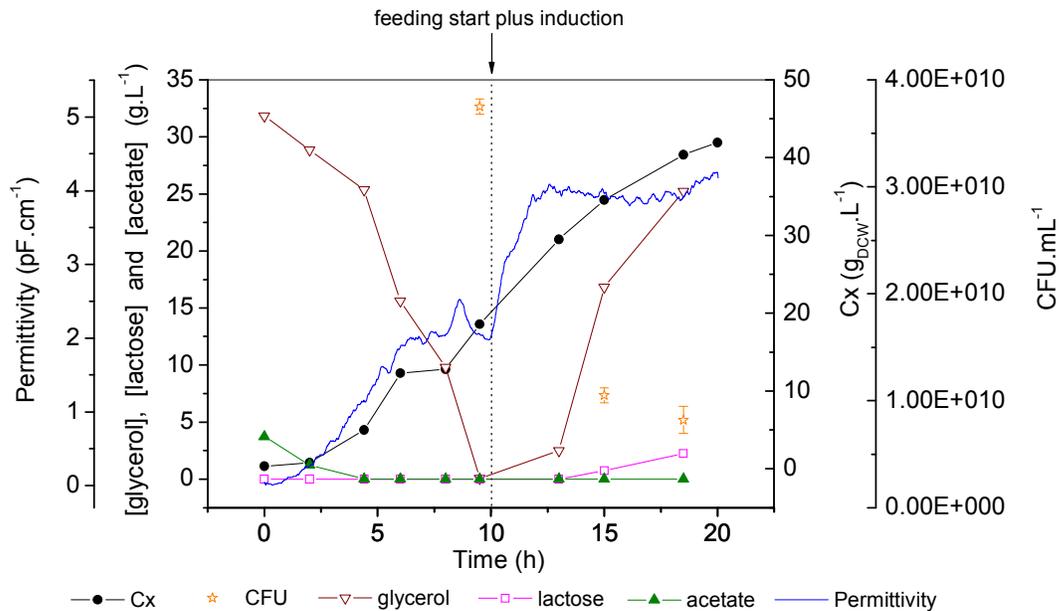


Figure 3 – Cell growth, substrate consumption and metabolites formation during Experiment #3. Growth on glycerol during batch phase; fed-batch and induction using glycerol plus lactose. Error bars in CFU are standard deviations from triplicates.

As also observed in Experiment #2, glycerol accumulation occurred after the mid fed-batch phase but lactose was almost completely consumed, showing that glycerol concentration can be reduced in the formulation of the supplementary medium. In this experiment the growth deceleration during heterologous protein expression was not as intense as in Experiment #2, neither was the accumulation of lactose. Therefore, lower lactose concentrations – for instance, in the range of 80 g.L^{-1} (half of that used in Experiment #2) – might be enough to promote an efficient induction in a gradual manner. The absence of lactose in the batch medium and the control of μ matching the actual growth rate were other successful changes implemented in this experiment. Together, they allowed intense growth towards $40 \text{ g}_{\text{DCW}}.\text{L}^{-1}$ within 20 h of cultivation. As discussed by Sandén *et al.* (2002), higher specific growth rates favor protein production by influencing both the protein synthesis apparatus and the energy production.

Experiment #4 was carried out according to the conventional induction strategy, using a pulse of inducer after biomass is accumulated, but with lactose instead of IPTG to induce recombinant protein synthesis. Results of this cultivation are shown in Figure 4.

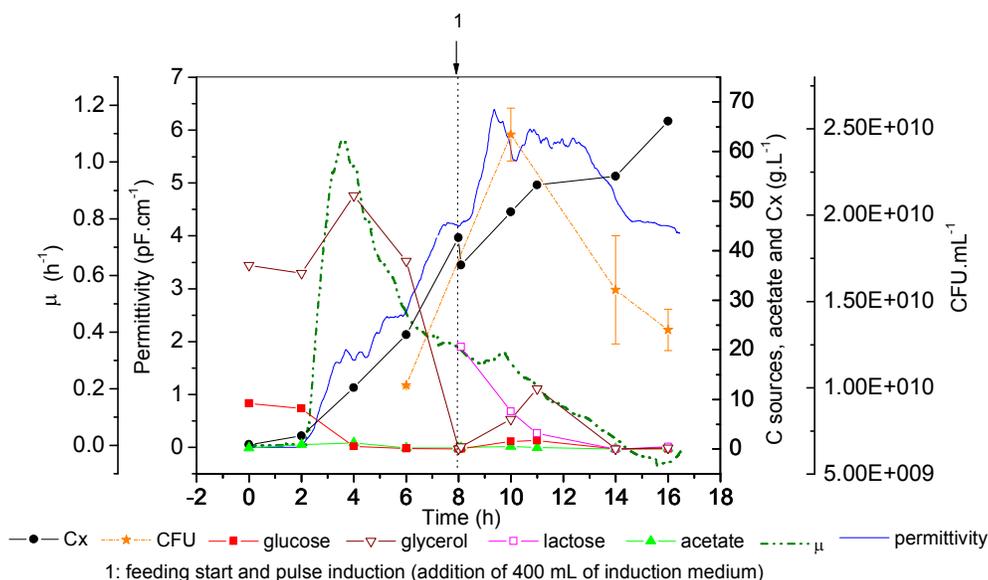


Figure 4 – Cellular growth, substrate consumption and metabolites formation during Experiment #4. Growth on glycerol and glucose during batch phase; Fed-batch using glycerol and induction by a lactose pulse. Error bars in CFU are standard deviations from triplicates.

Biomass formation was improved by a combination of glucose and glycerol in the batch phase and after only 7 h a cellular concentration of about 30 g.L⁻¹ was reached. Despite such an intense cellular growth, there was no accumulation of organic acids.

Permittivity data matched the biomass formation profile up to 8 h from the onset of the experiment, when induction, by a lactose pulse, took place. As also observed in Experiment #3, as protein expression triggers an increase of metabolic activity, the capacitance probe signal is affected (see Figure 4, between 8-10 h).

A maximum of 66 g_{DCW}.L⁻¹ was achieved after only 16 h of cultivation. Such a high biomass productivity can be associated mainly to two aspects of this experiment: i) the improved batch medium, containing glycerol plus glucose and; ii) the feeding rate controlled in such a way to sustain the real growth rate of the cells, which was inferred on-line from data collected by the capacitance probe. In fact, at the beginning of the exponential feeding phase (6.8 h of cultivation), the value of μ_{SET} was around 0.35 h⁻¹, which is significantly higher than the pre-defined μ_{SET} used in Experiments #1 and 2 (0.13 h⁻¹).

The free software SuperSys_HCDC was used to control the feeding flow rate. Based on the broth permittivity signal from the capacitance probe, the supervisory system retuned the parameters of the feed flow control each 10 min. Thus, biomass growth was limited by the cells own growing capacity, and not by the parsimonious feed of a limiting substrate. The feeding flow decreased with time after induction, accompanying the growth deceleration caused by the recombinant protein expression.

Glycerol as carbon source in the supplementary medium did trigger the aerobic acetic fermentation as reported by Korz *et al.* (1995), but the production of acetate was negligible. This is a remarkable difference with respect to growing cells on glucose at high rates. The saturation of the cellular catabolic fluxes, typical for cultivations using glucose, is not observed for glycerol, due to its lower uptake rate by the cells. This fact allows one to feed the bioreactor in such a way that cells are able to grow at high specific rates without accumulation of toxic by-products. On the other hand, during the batch phase, a balanced mixture of both carbon sources leads to fast biomass formation but also without acetic acid accumulation.

The cell concentration drop observed in the moment of induction (at 8h, see Figure 4) is caused by the dilution of the broth after the addition of 400 mL induction medium.

During the fed-batch phase, lactose consumption led to a slight accumulation of glycerol, as lactose, besides its intrinsic induction activity, acts as a carbon source. However, after lactose depletion, the accumulated glycerol was readily consumed.

A comparison of results from the four cultivations is presented in Table 3.

Table 3 – Comparison of cell growth results, including standard deviations of estimated kinetic parameters

	Experiment #1	Experiment #2	Experiment #3	Experiment #4
μ_{\max} (h ⁻¹)	1.12 ± 0.05	0.80 ± 0.27	0.62 ± 0.05	1.08 ± 0.02
Y _{x/s} (batch phase)	0.60 ± 0.01	0.57 ± 0.04	0.59 ± 0.05	0.64 ± 0.04
Final C _x (g.L ⁻¹)	20.9	13.5	41.9	66.1
[acetate] maximum	2.1	5.0	3.7	1.2
[formiate] maximum	3.1	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: not detected;

As it can be seen in Table 3, the highest μ_{\max} value was achieved when cells were cultivated using glucose (Experiment #1), and cultivation #3, where glycerol was the carbon source, showed the lower maximum specific growth rate, as expected. Intermediate values of μ_{\max} were observed where a mixture of substrates was used (#2 and #4). The balanced composition used in Experiment #4 led to a high μ_{\max} value, of 1.08 h⁻¹. Table 3 also shows that biomass yield coefficients were not significantly influenced by the carbon sources present in the media. As expected, growing on glucose (#1) led to significant amounts of formic and acetic acids production, while in the other experiments no formic acid nor other toxic metabolic by-products were detected at all. Lactose feeding in Experiments #2 and #3 induced acetate production, which is related to the degradation of this sugar into glucose and galactose. The latter is not consumed by *E. coli* BL21(DE3) cells, but glucose metabolism could favor acetate formation under the stressing conditions of heterologous protein over expression.

INDUCTION STRATEGY AND PROTEIN PRODUCTION

The rSpaA protein was expressed in the form of inclusion bodies and different levels of protein production were reached according to the induction strategy adopted (Figure 5 a, b). For the classical process, where cells were grown in modified LB medium and induced by an IPTG pulse (Experiment #1), the maximum rSpaA specific production reached $0.14 \text{ g}_{\text{prot}} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1}$ after four hours of induction. This value corresponds to approximately 25 % of total cellular protein content – considering that total cellular protein content is around 55 % of its dry weight (Neidhardt and Umbarger, 1999).

A better efficiency for recombinant protein production was registered for the auto-induction protocol (Experiment #2). Lactose from batch and feeding media gradually activated rSpaA expression and the highest protein specific production from all experiments performed ($0.16 \text{ g}_{\text{prot}} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1}$) was achieved after 8h of culture. On the other hand, the high metabolic load, caused by prolonged and intense induction, impaired cellular growth.

The auto-induction protocol showed to be very efficient to achieve high levels of protein expression within a short period. However, it does not seem to be appropriated for fed-batch cultures because the high cellular concentrations desired in this mode of operation cannot be reached due to the intense metabolic burden associated to the prolonged and early induction process.

Feeding lactose as inducer in the supplementary medium (Experiment #3) resulted in high rSpaA specific and volumetric productivity at the end of the cultivation ($0.15 \text{ g}_{\text{prot}} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1}$ and $0.323 \text{ g}_{\text{prot}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively), which confirm the good performance of the alternative induction protocol. Recombinant SpaA accumulated up to almost $6.0 \text{ g}_{\text{prot}} \cdot \text{L}^{-1}$, corresponding to around 27 % of total cellular protein content after 8.5 h of induction.

Addition of a lactose pulse to induce recombinant protein expression was tested in Cultivation #4. Although the rSpaA specific production was the lowest registered in all the four experiments, the volumetric productivity reached was the highest among all the strategies, due to the great biomass productivity.

The lactose concentration of $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in the moment of induction was superior to values commonly reported in the literature (Lim *et al.*, 2004b; Neubauer *et al.*, 1992). It led to an amount of 76.5 g of lactose totally consumed within 3.3 h after its

addition. Compared to the total amount of lactose fed in the other experiments in the same 3.3 h (10.5 g in #2 and 36.1 g in #3), the value of 76.5 g used in #4 was not too low to sustain the same pattern of induction in the continuously growing cell population.

Once biomass concentration during induction phase of Experiment #4 was significantly higher than in Experiments #2 and #3, a better comparison is provided by estimating the overall specific lactose uptake rates (OSLUR) and overall specific glycerol uptake rates (OSGUR) for each of them during the first 3.3 h of induction. Rather similar values for OSLUR (0.09 for Experiments #2 and #3 and $0.11 \text{ g}_{\text{lactose}} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for Experiment #4) and for OSGUR (0.47 and $0.41 \text{ g}_{\text{glycerol}} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for Experiments #3 and #4, respectively) were observed. The OSGUR of Experiment #2 was rather lower ($\sim 0.23 \text{ g}_{\text{glycerol}} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) due to the reduced glycerol uptake associated to the low biomass build-up caused by the early protein expression triggered by auto-induction protocol. Thereby, these results suggest that the inferior specific protein production observed at Experiment #4 was not caused by lack of lactose. Instead, it seems to be related mainly to the way lactose was supplied. It seems that continuous inducer feeding (Exps #2 and #3) modulates the transcription rate extending the production phase and leading to better yields (Striedner *et al.*, 2003). Pinsach *et al.* (2008) reported the same differences between pulse induction and continuous inducer dosage using IPTG, and better results were also achieved using the inducer feeding protocol.

In spite of that, as stated before, the highest volumetric productivity was reached at Experiment #4, since rSpaA production did not impair cellular growth and high biomass concentration was reached in a short period of time. Subsequent lactose pulses could be done to increase the specific protein production. Similarly, the addition of the supplementary feed containing lactose could be delayed and preceded by a glycerol containing feed medium to improve biomass accumulation.

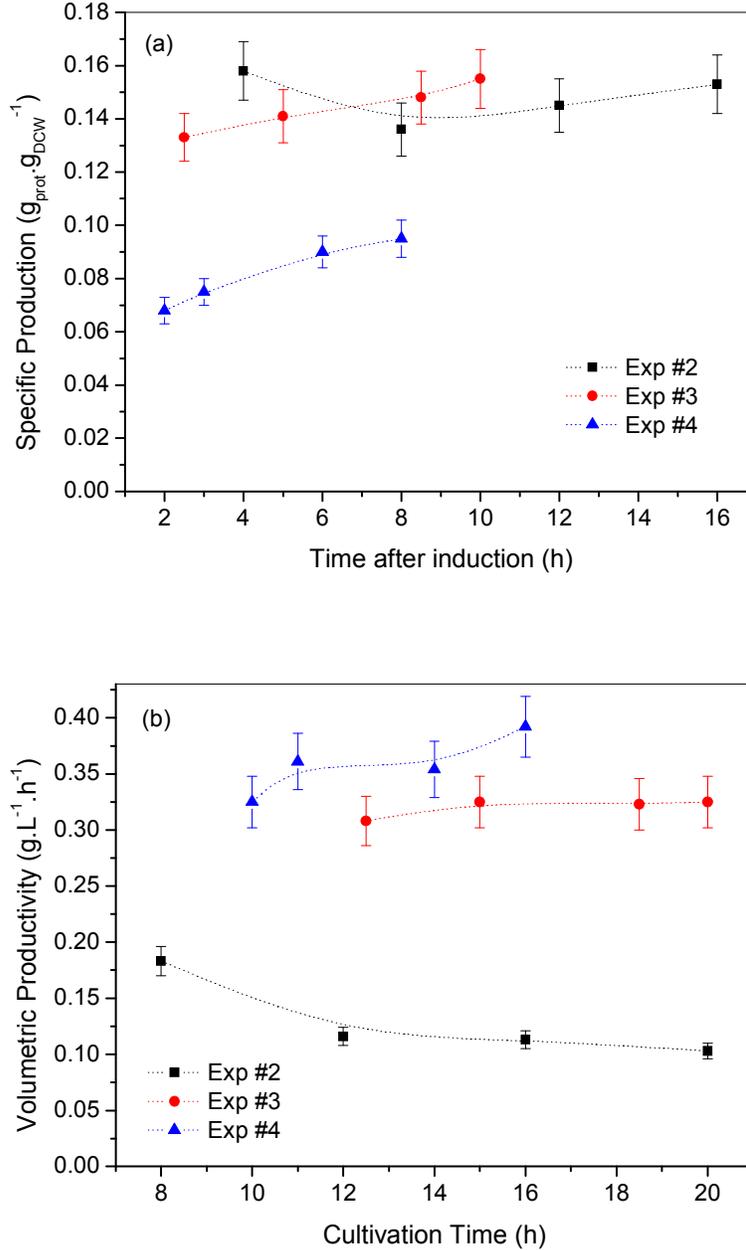


Figure 5 – Comparison of rSpaA specific production (a) and volumetric productivity (b) over time for the lactose induced protein expression. For Experiment #2, the induction was assumed to start after 4h from the onset of the experiment, which corresponds to the moment when glucose was exhausted.

For the auto-induction experiment (#2), the reasonable values of protein specific production and volumetric productivity reached after only 8 h of cultivation (that corresponds to a few hours after the end of the batch phase) shows that such protocol is better suited for short experiments, namely batch cultures, where high

protein production can be achieved within a few hours by the early induction of expression.

In the other experiments, with shorter periods of induction, protein specific production and volumetric productivity did not decrease when the growth rate decelerated. Experiment #1, induced by IPTG, had the shortest induction phase and protein specific production and volumetric productivity were evaluated only at the end of the process ($0.136 \text{ g}_{\text{prot.}} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1}$ and $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively).

In fact, Figure 5 shows that time plays a less important role than expected during the induction phase. First of all, data depicted at Figure 5 (a, b) show that significant protein accumulation in the cell was already attained after 2 – 3 h of continuous induction with lactose, what is rather shorter than the usual, minimum 8 h of induction. Generally speaking, the specific production (protein/cell mass) increased slightly with time (with one exception at the beginning of induction of Experiment #2) while the effect on volumetric productivity of the protein was not monotonic, due to the different growth rates after induction. Experiment #4, in particular, showed a trend towards increasing productivities as time goes by.

Table 4 compares results from this work to other published data for *E. coli* cultures employed for biopharmaceutical proteins production. The strategy used in Experiment #4 was able to achieve a protein volumetric productivity among the highest reported, after a short bioreactor run (16 h). It should be noticed that the recombinant biomolecule produced here has 45 kDa, while the others are much smaller proteins, being in the range of 7 to 28 kDa, except for streptokinase.

Table 4 – Comparison of productivity profile of some biopharmaceutical proteins produced by *E. coli* BL21(DE3) HCDC in complex medium in the last decade to results obtained in this work.

Product & molecular weight	Carbon source / inducer	Culture time (h)	Biomass Productivity ($\text{g}_{\text{DCW}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Protein Volumetric Productivity ($\text{g}_{\text{prot}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Protein Specific Production ($\text{g}_{\text{prot}} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1}$)	Product conc. ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Reference
Tilapia insulin-like growth factor - 2 - 7 kDa	Glucose / IPTG	30	5.20	0.32	0.062	9.69	Hu <i>et al.</i> (2004)
Human soluble B lymphocyte stimulator (hsBLyS) - 17-18 kDa	Glucose / lactose	34	0.92	0.11	0.120	3.70	Li <i>et al.</i> (2006)
Streptokinase - 47 kDa	Glucose / IPTG	11	1.31	0.10	0.050	0.72	Goyal <i>et al.</i> (2009)
anti-cancer drug TATm-survivin (T34A) - 17 kDa	Glucose / IPTG	14	0.63	0.42	0.191	1.68	Zhang <i>et al.</i> (2009)
this work: SpaA from <i>E. rhusiopathiae</i> - 45 kDa	Glucose / IPTG	11.5	1.82	0.25	0.136	2.85	Exp #1 (t = 11.5 h)
	Glucose + glycerol + lactose / lactose	20	1.16	0.18	0.158	1.47	Exp #2 (t = 8 h)
	Glycerol / lactose	20	2.18	0.32	0.155	5.97	Exp #3 (t = 20 h)
	Glycerol + glucose / lactose	16	4.13	0.39	0.095	6.35	Exp #4 (t = 16 h)

Both protein specific production and volumetric productivity impact on process performance. In addition, for bioprocess optimization, the economics of each solution must be assessed, including the cost for disruption of cells and separation and purification of the protein.

Cellular productivity reflected the induction strategy and media formulation that were adopted. Conditions with prolonged periods of induction (Experiments #2 and #3) led to lower biomass productivity caused by the intense stress imposed to the cells. Formulations with glucose (#1) or glucose plus glycerol (#4) promoted fast growth, reducing the total time of the process.

Plasmid maintenance is also strongly influenced by the induction strategy employed. It remained between 96 and 100 % before induction for all experiments, and decreased in different intensities according to the induction regimen adopted, ranging from 70 % (Exps #2 and #3) to 95 % (Exp #4) at end of the processes. The metabolic burden imposed to plasmid-carrying cells after induction causes a growth deceleration, which favors the growth of plasmid-free cells, generated by unequal partition of plasmids between daughter cells (Summers, 1991). Shorter periods of

induction may prevent the accumulation of plasmid-free cells, avoiding a reduction in the protein productivity with time. Glucose in the batch medium is also supposed to have a beneficial effect on plasmid maintenance, as it represses expression leakage before induction by catabolite repression (Zhang *et al.*, 2003).

4. CONCLUSIONS

The production of heterologous proteins under the control of *lac* promoter in *E. coli* fed-batch cultures has been widely studied in the last 15 years. But, the majority of the reported studies focus on IPTG as inducer and defined media containing glucose as major carbon source.

IPTG is expensive, toxic and must be completely removed from the final product to comply with GMP guidelines (Merten *et al.*, 2001). Here we showed that lactose supplied continuously as part of feeding medium formulation is an effective approach to fully induce protein expression.

Concerning carbon sources, the balanced combination of glucose and glycerol in the batch medium is a simple way to boost growth even with glycerol as main substrate. Furthermore, during the fed-batch phase, growth on glycerol can be kept as high as 0.35 h^{-1} in complex medium without metabolite formation. This enables faster biomass production leading to shorter cultivations. Even when glycerol accumulated to 30 g.L^{-1} , neither metabolite formation nor inhibition of protein synthesis occurred, as it would actually happen if glucose was used, instead.

The auto-induction protocol also studied here showed to be best suited for simple batch cultivations, where great amounts of recombinant protein can be reached in a short period of time by running an easy-to-do experiment.

5. REFERENCES

Asami K. **Characterization of biological cells by dielectric spectroscopy.** *J Non-Cryst Solids* 2002, 305:268–277

Abramoff, MD, Magalhaes, PJ, Ram, SJ. **Image Processing with ImageJ.** *Biophotonics Int* 2004, 11:36-42

Demain A, Vaishnav P: **Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms.** *Biotechnol Adv* 2009, **27**: 297-306

Eilers, PHC: **A Perfect Smoother,** *Anal Chem* 2003, **75**: 3631-3636

Freeman MJ: **Effects of vaccination on the development of arthritis in swine with erysipelas: clinical, hematological, and gross pathological observations.** *Am J Vet Res* 1964, **27**: 597-606

Goyal D, Sahni G, Sahoo DK: **Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture.** *Bioresource Tech* 2009, **100**: 4468–4474

Horta ACL, Zangirolami TC, Giordano RC, Cruz AJG, Reis GB, Jesus CDF: **Supervisory system for bioreactor high cell density cultivations,** Registered software, process no. 11008-6, RPI 2115, INPI, Brazil, 2011.

Hu SY, Wu JL, Huang JH: **Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*.** *J Biotechnol* 2004, **107**:161-171

Imada Y, Goji N, Ishikawa H, Kishima M, Sekizaki T: **Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs.** *Infect Immun* 1999, **67**:4376-4382

Keener J, Nomura M: **Regulation of Ribosome Synthesis.** In: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd edition. Edited by Neidhardt FC. Washington D.C., ASM Press 1999, Chapter 90: 1

Kitajima T, Oishi E, Amimoto K, Ui S, Nakamura H, Oda K et al: **Quantitative diversity of 67 kDa protective antigen among serovar 2 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its implication in protective immune response.** *J Vet Med Sci* 2000, **62**:1073-1077

Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD: **Simple fed batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli***. *J Biotechnol* 1995, **39**:59-65

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

Lee SY: **High cell-density culture of *Escherichia coli***. *Trends Biotechnol* 1996, **14**:98-105

Li Z, Zhang X, Tan T: **Lactose-induced production of human soluble B lymphocyte stimulator (hsBLyS) in *E. coli* with different culture strategies**. *Biotechnol Lett* 2006, **28**: 477-483

Liljeqvist S, Stahl S: **Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines**. *J Biotechnol* 1999, **73**:1-33

Lim HK, Kim SG, Jung KH, Seo JH: **Production of the kringle fragments of human apolipoprotein(a) by continuous lactose induction strategy**. *J Biotechnol* 2004, **108**:271-278

Matanguihan RM, Konstantinov KB, Yoshida T: **Dielectric measurement to monitor the growth and the physiological states of biological cells**. *Bioprocess Eng* 1994, **11**:213-222

Merten OW, Mattanovich D, Lang C, Larsson G, Neubauer P, Porro D, Postma P, Teixeira de Mattos J, Cole JA: **Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells: Selected Articles from the Meeting of the EFB Section on Microbial Physiology, Semmering/A, 5-8 October 2000**. In: *A Comparative View on Host Physiology*. Netherlands, Kluwer Academic Publishers 2001

Neidhardt FC, Umberger HE: **Chemical Composition of *Escherichia coli***. In: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd edition. Edited by Neidhardt FC. Washington D.C., ASM Press 1999, Chapter 3: 2

Neubauer P, Hofmann K, Holst O, Mattiasson B, Kruschke P: **Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer**. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992, **36**:739-744

Nielsen J, Villadsen J, Lidén G: **Bioreaction Engineering Principles**, 2nd edition. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers 2002, 16.

Pinsach J, de Mas C, López-Santín, J: **Induction strategies in fed-batch cultures for recombinant recombinant protein production in *Escherichia coli*: application to rhamnulose 1-phosphate aldolase**. *Biochemical Engineering Journal* 2008, **41**:181-187

Sambrook J, Russell DW: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3rd edition. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press 2001

Sandén, AM, Prytz I, Tubulekas I, Förberg C, Le H, Hektor A *et al*. **Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins**. *Biotech Bioeng* 2002, **81**:158-166

Shiloach J, Fass R: **Growing *E. coli* to high cell density: a historical perspective on method development**. *Biotech Adv* 2005, **23**:345-357

Shojaosadati SA, Kolaei SMV, Babaeipour V, Farnoud AM: **Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein**. *Iran J Biotechnol* 2008, **6**:63-84

Striedner C, Cserjan-Puschmann M, Potschacher F, Bayer K: **Tuning the transcription rate of recombinant protein in strong *Escherichia coli* expression systems through repressor titration**. *Biotechnology Progress* 2003, **19**:1427-1432

Studier FW: **Protein production by auto-induction in high-density shaking culture.** *Protein Express Purif* 2005, **41**: 313-322

Summers DK: **The kinetics of plasmid loss.** *TIBTECH* 9 1991, 273-278

Wood RL: **Erysipelas.** *In-Disease of swine*, edited by Leman AD *et al.* Iowa, Iowa State University Press 1992, 475-486

Zhang H, Zheng Y, Liu Q, Tao X, Zheng W, Ma X, Wei D: **Development of a fed-batch process for the production of anticancer drug TATm-survivin(T34A) in *Escherichia coli*.** *Biochem Eng J* 2009, **43**: 163-168

Zhang Y, Taiming L, Liu J. **Low temperature and glucose enhanced T7 RNA polymerase-based plasmid stability for increasing expression of glucagon-like peptide-2 in *Escherichia coli*.** *Protein Express Purif* 2003, **29**: 132-139

Anexo 1 – Termo de transferência de material: Acordo de envio da proteína rSpaA purificada para a empresa espanhola de produtos veterinários Hipra S.A.

TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL

1. O presente termo de transferência de material tem como REMETENTE FUNDAÇÃO DE APOIO INSTITUCIONAL AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO – FAI.UFSCar, com sede na Rodovia Washington Luiz, Km 235, São Carlos-SP, inscrita no CNPJ sob o nº. 66.991.647/0001-30, representada por seu Diretor Executivo Prof. Dr. Paulo Ignácio Fonseca de Almeida, e como DESTINATÁRIO a sociedade LABORATORIOS HIPRA, S.A., com sede na Avenida La Selva, 135, 17170 Amer, Girona (Espanha) e número de identificação fiscal A-28063675, neste ato representada pelo seu Diretora Geral, Sra. Maria del Mar Nogareda Estivill, sob nomeação do 23 de Junho do 2005.

2. Todas as informações trocadas entre as partes, como resultado deste Termo e da assinatura do presente Acordo, deve ser tratado de forma confidencial e secreto durante a vigência do presente Acordo e após o seu término, por qualquer motivo, e só podem ser utilizados para atender com as obrigações decorrentes do presente acordo.

3. O REMETENTE declara que tem autoridade suficiente para fazer esta transferência sem incorrer em uma infração ou violação de quaisquer direitos e, portanto, transfere gratuitamente para o DESTINATARIO o Material de acordo com a descrição prevista na cláusula seguinte- nos restantes termos e condições acordadas no presente Acordo.

4. A amostra contém 1 mg de proteína recombinante SpaA de Erysipelothrix rhusiopathiae, consistindo em um fragmento com 342 aminoácidos mais uma cauda com seis resíduos de histidina fusionada na porção C-terminal, expressa por células de Escherichia coli e parcialmente purificada, conforme descrição a seguir. A proteína produzida pelas células de E. coli na forma de corpos de

ACUERDO DE TRANSFERENCIA DE MATERIAL

1. Este acuerdo de transferencia de material tiene como REMITENTE a FUNDAÇÃO DE APOIO INSTITUCIONAL AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO – FAI.UFSCar, con sede en Rodovia Washington Luiz, Km 235, São Carlos-SP, inscrita no CNPJ sob o nº. 66.991.647/0001-30, representada por su Director Ejecutivo Prof. Dr. Paulo Ignácio Fonseca de Almeida, y como DESTINATARIO a LABORATORIOS HIPRA, S.A., con domicilio social en Avenida La Selva, 135, 17170, Amer, Girona (España) y número de identificación fiscal ES A-28063675, representada en este acto por su Directora General, la Sra. Maria del Mar Nogareda Estivill, en virtud de su nombramiento de fecha 23 de Junio de 2005.

2. Toda la información intercambiada entre las partes como consecuencia de este Acuerdo, así como la firma de este Acuerdo, será tratada con carácter reservado y secreto tanto durante la vigencia de este Acuerdo como tras su terminación por cualquier causa, y sólo podrá ser usada para cumplir con las obligaciones establecidas en este Acuerdo.

3. El REMITENTE declara que tiene facultades suficientes para realizar esta transferencia sin incurrir en violación o infracción de derecho alguno y que, por ello, transfiere gratuitamente al DESTINATARIO el Material -según descripción prevista en la siguiente cláusula- en los términos y condiciones acordados en este Acuerdo.

4. La muestra contiene 1 mg del fragmento recombinante de la proteína SpaA de Erysipelothrix rhusiopathiae. Este fragmento contiene 342 aminoácidos mas una cola de histidina fusionada en la porción C-terminal, expresada en la forma de cuerpos de inclusión por células de Escherichia coli. La proteína fue parcialmente purificada en condiciones desnaturantes y se encuentra en tampón fosfato (pH 4.5) con urea 8 M. No han sido realizados tratamientos adicionales de la muestra purificada para la detección o remoción de posibles residuos



10211-12

inclusão foi purificada em condições desnaturantes. A proteína parcialmente purificada foi obtida em tampão fosfato (pH 4,5) contendo uréia 8 M ou ainda em tampão fosfato (pH 7,4) contendo hidrócloro de guanidina 6 M e imidazol 500 mM. Nenhum tratamento adicional da amostra purificada foi feito para detecção ou remoção de possíveis resíduos de lipopolissacarídeos (LPS). Em conjunto ou separadamente será, doravante, denominada Material. E DESTINATÁRIO reconhece desde já que o Material é de propriedade exclusiva do REMETENTE. 5. O REMETENTE diz que não conhece nenhum caso, ato, conduta ou direitos de terceiros que impeçam ou restrinjam a transferência do Material. Para o caso onde o DESTINATÁRIO recebe uma denúncia de um terceiro em relação aos direitos de propriedade ou a transferência para o Material, o REMETENTE se compromete a manter indene ao DESTINATÁRIO.

6. O presente Termo não confere ao DESTINATÁRIO nenhum direito de propriedade sobre estes materiais.

7. O material recebido não será repassado para terceiros, outras pessoas ou instituições, sem uma permissão escrita do REMETENTE.

8. O material recebido deverá ser utilizado pelo DESTINATÁRIO exclusivamente para fins de pesquisa, especificamente na caracterização de um antígeno do Destinatário.

9. É vedada a utilização do material para qualquer outro estudo, pesquisa que não seja o descrito na cláusula anterior assim como sua exploração comercial.

10. O DESTINATÁRIO declara que aceita o Material com o conhecimento de que é material experimental e que será fornecido pelo REMETENTE sem qualquer garantia quanto à consecução dos resultados técnicos, expressa ou implícita.

11. O DESTINATÁRIO se compromete a compartilhar com o REMETENTE as

lipopolissacarídeos (LPS). En conjunto o por separado, en adelante, denominado el Material. El DESTINATARIO reconoce que el Material es de propiedad exclusiva del REMITENTE.

5. El REMITENTE declara que no conoce ningún hecho, acto, conducta o derecho de terceros que impida o limite la transferencia del Material. Para el caso en que el DESTINATARIO recibiera alguna reclamación de un tercero en relación a la titularidad o derechos sobre el Material transferido, el REMITENTE se obliga a dejar indemne al DESTINATARIO.

6. Este acuerdo no concede al DESTINATARIO ningún derecho de propiedad sobre el Material.

7. El Material recibido no será transmitido a terceros u otras personas o instituciones sin autorización escrita del REMITENTE.

8. El Material recibido será utilizado por el DESTINATARIO únicamente para fines de investigación, en concreto, para caracterizar un antígeno del DESTINATARIO.

9. Está prohibido el uso del Material para cualquier estudio o investigación que no sea el previsto en la cláusula anterior, así como su explotación comercial.

10. El DESTINATARIO acepta el Material conociendo que es material experimental y que es ofrecido por el REMITENTE, sin ninguna garantía, expresa o implícita, respecto de la consecución de resultados técnicos.

11. El DESTINATARIO se compromete a compartir con el REMITENTE las informaciones científicas resultantes de la investigación utilizando el Material transferido, garantizando, inclusive, la participación eventual en la propiedad intelectual generada con base en el Material. Queda entendido y convenido que las investigaciones desarrolladas de forma aislada por las PARTES, no darán a las Partes ningún derecho de cotitularidad u otra especie de participación en la propiedad intelectual generada eventualmente por las PARTES.

W. M. A. R.

informações científicas advindas dos resultados da pesquisa, utilizando o material transferido, garantindo, inclusive, a participação em eventual propriedade intelectual gerada com base no MATERIAL. Ficando claro e expressamente convencionado que as pesquisas desenvolvidas isoladamente pelas PARTES não ensejarão nenhum direito de cotitularidade ou outra espécie de participação em propriedade intelectual eventualmente gerada pelas PARTES.

12. O DESTINATÁRIO se compromete a:

- a) não reivindicar, em nome próprio, qualquer forma de propriedade intelectual sobre o todo ou parte das Amostras transferidas por força deste Termo;
- b) não reivindicar a propriedade sobre as Amostras transferidas;
- c) não publicar artigos técnicos ou científicos nem promover qualquer divulgação referente às pesquisas e testes com as Amostras objeto do presente Termo sem o consentimento do REMETENTE;
- d) não permitir que terceiro tenha acesso às Amostras objeto da presente remessa sem prévia celebração de Termo de Transferência de Material próprio para este fim;
- e) repassar ao REMETENTE indicação completa das pessoas físicas ou jurídicas para as quais as Amostras transferidas pelo REMETENTE eventualmente venham a ser disponibilizadas.

13. Exceto no caso mencionado na condição 5 (cinco) do presente Termo, o DESTINATÁRIO assume, isolada e exclusivamente, a responsabilidade civil por eventuais danos diretos causados a terceiros em decorrência do uso do Material transferido pelo REMETENTE, inexistindo qualquer solidariedade entre as partes em caso de reclamação judicial ou extrajudicial.

14. O presente Termo terá vigência pelo prazo de 5 (cinco) anos a partir de recepção pelo DESTINATÁRIO os Material.

15. O descumprimento do disposto neste Termo implicará na aplicação das sanções

12. El DESTINATARIO se compromete a:

- a) No reclamar, en nombre propio, ningún tipo de propiedad intelectual sobre la totalidad o parte del Material transferido en virtud de este Acuerdo;
- b) No reclamar la propiedad del Material transferido;
- c) No publicar artículos técnicos o científicos, ni promover cualquier divulgación referente a las investigaciones y ensayos con el Material objeto del presente Acuerdo sin el consentimiento de la REMITENTE;
- d) No permitir que terceros tengan acceso al Material objeto del presente Acuerdo sin la firma de un Acuerdo de Transferencia del Material, necesario para ese objetivo;
- e) Comunicar al REMITENTE las personas físicas o jurídicas a las cuales se va a facilitar el Material transferido por el REMITENTE.

13. Excepto en el caso señalado en la condición 5 de este Acuerdo, el DESTINATARIO asume, única y exclusivamente, la responsabilidad civil por los eventuales daños directos causados a terceros derivados de la utilización del Material transferido por el REMITENTE, no existiendo, en estos casos, ningún vínculo entre las partes en caso de reclamación judicial o extrajudicial.

14. La duración de este Acuerdo será de 5 (cinco) años a partir de la recepción por el DESTINATARIO del Material.

15. El incumplimiento de las disposiciones de este Acuerdo implicará la aplicación de sanciones administrativas, civiles y penales previstas en la legislación vigente, sin perjuicio de las acciones legales correspondientes, emprendidas a fin de indemnizar los daños morales y materiales que correspondan por el incumplimiento del mismo.

16. Para resolver las cuestiones que se deriven del incumplimiento de las condiciones del presente Acuerdo, las Partes se someten a los Tribunales correspondientes a la comarca de Sao Carlos (Brasil), renunciando a cualquier otro fuero, por más privilegiado que sea.

17. Este acuerdo tiene como proponente al REMITENTE y, como tal, está sometido a la legislación brasileña, que se rigen por él, incluso

administrativas e cíveis e penais previstas na legislação vigente, sem prejuízo de serem tomadas as medidas judiciais visando a recomposição de eventuais danos morais e matérias havidos pelo descumprimento do mesmo.

16. Para dirimir eventuais questões oriundas do descumprimento das condições deste Termo, as partes elegem o Foro da Comarca de São Carlos (Brazil), com renúncia expressa a qualquer outro, por mais privilegiado que seja.

17. O presente termo tem como proponente a REMETENTE e como tal, se submete a legislação brasileira, sendo por ela regulada inclusive em caso de lacuna, renunciando expressamente pelas partes qualquer outra legislação, por mais privilegiada que seja.

18. O presente termo é lavrado em português e espanhol, havendo divergência entre as versões do presente termo prevalecerá sempre a versão em português.

E, por estarem assim acordadas, as partes firmam o presente Termo em duas vias de igual teor e forma, na presença das testemunhas abaixo identificadas.

São Carlos, 7 de SETEMBRO de 2011.

Prof. Dr. Paulo Ignácio Fonseca de Almeida
Diretor Executivo FAI - UFSCar

REMETENTE

Assinatura e carimbo dos representantes

LABORATORIOS HIPPA, S.A.
DIRECTORA GENERAL

DESTINATARIO

Assinatura e carimbo dos representantes

Testemunhas:

Teresa Cristina Zangirolami
Nome: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami
CPF: 068.705.808-20

en caso de omisión, renunciando a cualquier otra legislación, pormás privilegiada que sea.

18. Este Acuerdo se ha celebrado en portugués y español, habiendo divergencias entre las dos versiones, prevalecerá la versión en portugués.

Y concordando con este término, las partes firman el presente Acuerdo, en dos ejemplares con igual contenido y forma, en la presencia de los testigos identificados a continuación.

São Carlos, 7 de SETEMBRO de 2011.

Prof. Dr. Paulo Ignácio Fonseca de Almeida
Diretor Executivo FAI - UFSCar

REMITENTE

Sello y firma de los representantes

LABORATORIOS HIPPA, S.A.

DIRECTORA GENERAL

DESTINATARIO

Sello y firma de los representantes

Testigos:

Nome: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

CPF: 068.705.808-20



PARTE 2 – Clonagem e caracterização do antígeno SpaA em vetor bacteriano vivo: emprego de linhagem recombinante atenuada de *Salmonella typhimurium* e vetor plasmidial pMOhly1 para veiculação e secreção *in vivo* do antígeno rSpaA de *E. rhusiopathiae*

Seção 3.3 – Artigo 3: Mini revisão sobre vetores bacterianos vivos

Live bacterial vaccine vectors: an update

Adilson José da Silva¹; Maria Teresa Marques Novo²; Roberto de Campos Giordano¹; Elizabeth Angélica Leme Martins³; Teresa Cristina Zangirolami¹

1- Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal de São Carlos
Rod. Washington Luís, km 235 – CEP: 13565-905 – São Carlos – SP – Brazil

2 – Departamento de Genética e Evolução – Universidade Federal de São Carlos
Rod. Washington Luís, km 235 – CEP: 13565-905 – São Carlos – SP – Brazil

3 - Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan
Avenida Vital Brasil, 1500 – CEP: 05503-900 – São Paulo – SP – Brazil

ABSTRACT

After decades of research, genetically attenuated microorganisms can now be engineered in such a way that they are able to stimulate the host immune system, and deliver recombinant heterologous antigens without causing a real infection. Attenuated pathogens and some commensal bacteria are able to raise an immune response to heterologous antigens, while still offering a good level of safety. Another key feature of these live vectors is associated with their capacity to stimulate mucosal immunity, in addition to humoral and/or cellular systemic immune responses. This enables the use of different forms of vaccination to prevent pathogen colonization of mucosal tissues, which are the front door for many infectious agents. Furthermore, delivery of DNA vaccines (bactofection) and immunostimulatory molecules, such as cytokines, can be achieved using these special carriers, whose adjuvant properties and (sometimes) invasive capacities enhance the immune response to the stimuli. More recently, the unique features and versatility of these vectors have also been exploited to develop anti-cancer vaccines, where tumor-associated antigens, cytokines and DNA molecules are targeted and delivered. Different strategies and genetic tools are constantly being developed to increase the potential of antigenic agents transported by these delivery systems, and to open fresh perspectives for the deployment of these special vehicles for new purposes. Here we summarize the main characteristics of the different types of live bacterial vectors, reported by a large number of researchers, and discuss new applications of this delivery system in the field of vaccinology.

Keywords: bacterial vector; vaccine delivery system; DNA vaccine; cancer vaccine; antigen presentation.

INTRODUCTION

The strategy of using live bacterial cells as vehicles to deliver vaccine antigens has emerged over the past two decades as an interesting alternative procedure for the development of new vaccines. The evolution of genetic engineering techniques has enabled the construction of recombinant microorganisms capable of expressing heterologous proteins in different cellular compartments, with antigenic potential for producing vaccines against pathogens. There are examples of bacterial vector vaccines that are active against viral pathogens, bacteria and parasites, as described in Table 1.

Table 1 – Examples of live bacterial vaccine vectors under development for use against different classes of pathogen.

Vector	Pathogen	Antigen	Inoculation route	Animal model	Detected immune response	Reference
<i>Lactobacillus casei</i>	HPV 16	E7	Oral, subcutaneous, intramuscular	Mouse	Th1, CTL	[1]
<i>Listeria monocytogenes</i>	HIV	Gag	Oral and intramuscular	Rhesus monkey	IgG, Th1/Th2	[2]
<i>Salmonella typhi</i>	HIV	Gag, gp120	Intranasal	Mouse	IgA, IgG, CTL	[3]
<i>Salmonella typhimurium</i> SL7207	TGEV	Glycoprotein S DNA vaccine	Oral	Mouse	IgA, IgG	[4]
<i>Salmonella typhimurium</i> SL3261	<i>Schistosoma mansoni</i>	Sm14	Oral	Mouse	IgG	[5]
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	MSA2	Oral and nasal	Rabbit	IgA, IgG, Th	[6]
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Leishmania major</i>	LACK	Oral and intraperitoneal	Mouse	Th1	[7]
<i>Salmonella typhi</i> Ty21a	<i>Shigella dysenteriae</i>	O-Ps	Intraperitoneal	Mouse	IgG	[8]
<i>Vibrio cholerae</i> CVD 103-HgR.	<i>Escherichia coli</i>	Intimin	Oral	Rabbit	IgA	[9]
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	LTB	Oral	Mouse	IgA, IgG	[10]
<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	Pertussis toxin (PT)	Oral	Mouse	IgA	[11]

Intrinsic characteristics of these cells, such as surface structures composed of lipopolysaccharides in Gram-negative bacteria, or lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria, along with other pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), are recognized by *Toll-like* receptors (TLRs), resulting in the production of inflammatory cytokines and expression of other antimicrobial genes [12]. This innate immune response to bacterial pathogens makes them extremely efficient vehicles to stimulate specific and long-term immune responses against the antigens associated with them. Hence, besides production and delivery of the antigens, the innate features of these vectors can enable them to act as useful immunostimulating adjuvants.

Immune responses to LBVs

The characteristics of an antigen delivery system using live vectors enable it to readily induce a wide range of immune responses. Bacteria used as vectors exhibit a natural tropism for antigen-presenting cells, and therefore promote an antigen exposure that is sufficient to induce an immune response [13]. The bacterium *Salmonella enterica*, which is the most studied live bacterial vector (LBV), invades the M cells of the intestine and then infects macrophages [14], so that the heterologous antigens associated with this pathogen are presented to the immune system. Dendritic cells, which represent another class of antigen-presenting cells (APCs), capture *Salmonella* in the lamina propria and can also present the antigen [15].

The vector chosen can directly influence the type of immune response induced. Attenuated intracellular pathogens, such as *Salmonella*, *Listeria* and *M. tuberculosis*, are able to stimulate a strong cellular immune response [16], because these bacteria are able to survive within macrophages after being phagocytosed. Many of the molecular mechanisms used by these bacteria to survive within host cells are well known. They act by slowing the maturation of phagosomes and inhibiting their fusion with vesicles containing microbicidal substances [14], or by evading from inside the phagocytic vesicle directly to the cytoplasm, as shown by the bacterium *L. monocytogenes* [17], [18]. In these circumstances, the antigens ultimately stimulate cellular and humoral responses mediated by CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes [19].

Mucosal vaccines

An important advantage of using live bacteria for vaccine production is the possibility of exploiting an special compartment of the immune system, namely the mucosal immunity. Vaccines delivered by mucosal routes are designed to stimulate local and systemic immune responses [20], while formulations that employ other inoculation routes predominantly stimulate systemic immunity. Mucosal route vaccination strategies are associated with reduced side effects, offer easier administration and, in many cases, reduce costs of production and implementation [21], [22].

Although they are spatially compartmentalized, the different mucosal sites are immunologically connected, so that immune responses induced in a mucosal tissue can also be observed in another distant mucosal site [23], [24]. The secretion of IgA and IgM antibodies constitutes the major effector response exhibited by mucosa-associated lymphoid tissues (MALT) [25]. Since more than 90 % of infections in humans begin at mucosa sites [26], it is expected that the formation of a line of defense in these tissues should lead to a higher level of protection, and this can be achieved more easily by mucosal vaccination than by other means.

Pathogenic bacteria are particularly well adapted to interact with the mucosal surface, since most of them use this interaction to initiate the infection process, and as a result certain species of attenuated pathogenic bacteria have been extensively studied for the purpose of vaccine development. Amongst the most used are attenuated mutants of different *Salmonella* serotypes, such as *Salmonella enterica* serovar Typhi or Typhimurium [27], *Shigella flexneri* [28] and *Listeria monocytogenes* [29].

Administration of these vaccines is mostly via the nose or mouth, although the mucosa of the urogenital tract is also used [30], [31]. Some researchers argue that the respiratory route offers advantages over the oral route, since it avoids the acid and proteolytic environment of the stomach [22], [32]. In addition, local and systemic immune responses induced by intranasal vaccination are generally stronger than those induced by the same live bacteria vaccine administered orally [32]. For example, Cortes-Perez *et al.* (2007) [22] reported increased production of IFN-

gamma after nasal administration of a vaccine based on lactic acid bacteria carrying the antigen E7 of human papillomavirus type 16, compared to the oral route.

Microorganisms used as LBVs

Mutations have been employed to promote the attenuation of pathogenic bacteria used as vaccine vectors. Genetic engineering techniques have made it possible to identify and delete important virulence genes, creating bacterial vectors unable to revert to their pathogenic forms [33]. Several mutations have been described for different serotypes of *Salmonella*, and one of the most frequently used is the mutation *aroA* (as well as *aroC* and *aroD*), which blocks the ability of these microorganisms to synthesize aromatic compounds. The bacteria are therefore unable to reproduce in the host, but are still able to invade the small intestine and to persist there for a period of time long enough to produce the antigen in sufficient quantity to elicit an effective immune response [27]. Other mutations useful to attenuate pathogenicity affect the biosynthesis of adenine (*pur*), guanine nucleotides (*guaBA*) and proteins C and F of the outer membrane (*ompC*, *ompF*), as well as cAMP and AMP receptor expression (*cya/crp*), the conversion of UDP-galactose to UDP-glucose (*galE*), DNA recombination and repair (*recA*, *recBC*) and virulence gene regulation (*phoP phoQ*) [34]. Attenuations applied to *L. monocytogenes* have generated auxotrophic mutants [35], [36] or mutants whose virulence was reduced due to deletion of virulence factors such as the genes *actA* and internalin B (*inlB*) [37].

Lactic acid bacteria (LAB) have also been employed to deliver heterologous antigens. Several strains of *Lactobacillus* possess properties that make them attractive candidates for such purposes. Especially important is their GRAS (Generally Regarded As Safe) status (in contrast to attenuated pathogens, such as *Salmonella* and *E. coli*), as well as their ability to stimulate systemic and mucosal immune responses against epitopes associated with them [38]. Moreover, studies have indicated that certain species of *Lactobacillus* show a non-specific immunoadjuvant effect that is related to activation of macrophages [39]. However, the type of stimulus generated appears to be strain-dependent, and this is not well understood [40]. Difficulties in the use of members of this class of bacteria as efficient vectors are related to a limited understanding of their mechanisms of action in the

immune system, as well as to selection of the most suitable means of heterologous antigen presentation [41].

Other bacterial species that have been studied for heterologous antigen delivery include *Streptococcus gordonii* [42], [43], *Vibrio cholerae* [9], [44], *Mycobacterium bovis* (BCG) [45], [46], [47], *Yersinia enterocolitica* [48], [49] and *Shigella flexneri* [50], [51]. Relatively new species that have been investigated for use as vaccine vectors include *Pseudomonas aeruginosa* [52], *Bacillus subtilis* [10], [53] and *Mycobacterium smegmatis* [54], [55]. Others, especially in the veterinary field, have been developed with the aim of inducing a double protective immune response against a heterologous antigen and against the vector itself, such as *Erysipelothrix rhusiopathiae* [56], [57], *Mycoplasma gallisepticum* [58] and *Corynebacterium pseudotuberculosis* [59].

Antigen presentation

The form of antigen presentation seems to have a major impact on the magnitude and type of the immune response of the vaccinated organism. Kaufmann and Hess (1999) [60] reported that antigen secretion significantly increased the effectiveness of a vaccine used to fight intracellular pathogens. A number of bacterial secretion systems have been successfully used for this purpose. The Type I secretion system, for which the main prototype is the alpha-hemolysin of *E. coli*, allows the direct secretion of the entire protein to the extracellular medium without the formation of intermediates in the periplasmic space, by using a plasmid that encodes the HlyC, HlyB and HlyD proteins, along with the hemolysin secretion signal (HlyA_s), to be expressed linked to the recombinant antigen [21]. It replicates stably in various Gram-negative bacteria, including different serotypes of attenuated *Salmonella*, *Shigella* spp. and *Vibrio cholerae* [61]. Many vaccines have been developed for use against intracellular bacteria, parasites and viruses, based on the hemolysin secretion system [21].

The Type III secretion system has also been exploited for the development of vectors that secrete vaccine antigens. This system can be used effectively to deliver the antigens of interest directly into the cytosol of antigen-presenting cells, leading to activation of effectors and memory T CD8⁺ lymphocytes [62], [63]. Attenuated

pathogenic bacteria, such as *Salmonella* [64], *Yersinia* [49] and *Pseudomonas* [52] have already been used for delivery of antigens using this system.

The presentation of heterologous antigens on the surface of the bacterial vector has been used to induce immune responses using Gram-positive and Gram-negative bacteria [65]. This exposure of the antigen of interest is usually achieved by its expression fused to surface proteins of the vector [66], [67], and should mainly induce humoral immune responses [68]. Some examples of these fusion proteins include Lpp-OmpA, TolC and FimH of *E. coli*, OprF of *Pseudomonas*, VirG β of *Shigella*, IgA β of *Neisseria*, FliC of *Salmonella* and PulA of *Klebsiella* (reviewed by [65], [67], [68], [69]).

The AIDA (Adhesin Involved in Diffuse Adherence) auto-transporter system has also been used for the surface expression of model antigens that are important virulence factors of different pathogens. Some examples are the p60 antigen of *Listeria monocytogenes*, antigens OspA/OspG of *B. burgdorferi*, the LT-B subunit of *E. coli* and Stx-B subunits of enterohaemorrhagic *E. coli* [70].

Several proteins with the LPXTG anchoring motif, found in a number of species, have been employed to display heterologous antigens on the surface of Gram-positive vectors [71]. In the case of lactic acid bacteria, better results were achieved for antigens expressed on the cell surface, than for secreted antigens, suggesting that the immune response to heterologous proteins linked directly to the vector cells was more effective than that obtained for soluble antigens secreted by these vectors [40], [41].

Promoters for *in vivo* gene expression

In addition to the carrier selected and the nature of the immunogen, the choice of the promoter used to drive antigen expression also has a direct impact on the quality of the immune response generated by the LBV [72]. Various different expression promoters have been described in the literature, and used in the construction of plasmids to control the expression of recombinant genes. In the case of live bacterial vaccines, a special feature is desirable for the promoters controlling the expression of heterologous genes, namely *in vivo* induction according to specific characteristics of the microenvironment within the host. Frequently used promoters showing this property include: PpagC, a promoter related to the invasion and survival

of Salmonella inside macrophages [73]; PkatG, a promoter of catalase, induced by exposure of the microorganism to hydrogen peroxide generated by macrophages during infection [74]; PhtrA, induced by increasing temperature, and which controls the expression of Htra, required for survival of the microorganism in the macrophage [75]; PnirB, a promoter of NADH-dependent nitrite reductase, induced by anaerobiosis or by low oxygen pressure inside the host tissue [76]; OmpC, an outer membrane protein regulated by osmotic and pH changes in the environment; **ssaG**, a promoter located within the Salmonella Pathogenicity Island-2 (SPI-2), which encodes a type III secretion system involved in adapting the pathogen to the intravacuole environment within mammalian cells [77]. Comparative studies have examined the effectiveness of promoters in inducing the expression of specific antigens, as well as the resulting immune responses [74], [78].

The cytomegalovirus (CMV) promoter used for DNA vaccines is also the promoter used for delivery of DNA by live Salmonella, so that it can be recognized by the host transcription system [79], [80].

Investigations concerning promoters need to consider their stability in the microorganism during host invasion and maintenance, their ability to be activated *in vivo*, and the specific conditions of the environment in which they are activated, all of which are reflected in modulation of the immune response. The amount and quality (such as solubility or native structure) of protein expressed may reflect the immune response.

Bacterial spores as vaccine vectors

Recent research using *Bacillus subtilis* has demonstrated the possibility of delivering vaccine antigens and inducing an immune response using bacterial spore vectors [53]. Despite poor immunogenicity, due to low levels of antigen expression, and the short residence time of these spores in the gastrointestinal tract of the host after oral vaccination, the greater resistance to adverse external conditions for long periods, heat resistance, probiotic effects, low production cost and GRAS status make the spores of *B. subtilis* attractive for use in delivery of vaccine antigens [53], [81].

Paccez *et al.* (2006) [10] demonstrated that changing the expression system used could increase the immune response to these vectors. A system was

constructed for episomal expression under control of a promoter induced by stress conditions, which increased the response of IgG and S-IgA antibodies against the model antigen in mice. Zhou *et al.* (2008) [82] reported the use of spores of *B. subtilis* for the delivery of antigen Tp22.3, which conferred 45 % protection after oral vaccination in challenge tests against the parasite *Clonorchis sinensis* in mice. According to studies reported by Uyen *et al.* (2006) [83], using the tetanus toxin fragment C (TTFC) of *Clostridium tetani* as a model antigen in mice, expression of the antigen on the spore surface stimulated a Th1 response, while expression within the germinating spore led to a Th2-type response. Using the nasal route of inoculation, with the antigen expressed on the spore surface, it took 10 times fewer spores than required by the oral route to induce production of the same level of antibodies [83].

Cytokine and DNA delivery by LBVs

There are also antigen presentation strategies involving with the simultaneous expression and secretion of cytokines such as IL-12 [84], IL-4 and IL-18 [85]. The *in vivo* production of these and other cytokines can modulate the type of immune response exhibited by the vaccinated organism against heterologous antigens delivered to it [86].

The use of cytokines for therapeutic purposes has been successfully employed in several studies. The use of bacterial vectors is a useful alternative to simpler techniques, such as direct inoculation of purified molecules, as it increases the time of exposure of the organism to these substances [87]. This strategy was demonstrated by Xu *et al.* (1998) [87], in treatment of *Leishmania major* infection using attenuated *Salmonella* expressing IL-2, IFN-gamma, MIF and TNF- α . Delivery of genes coding cytokines, using bacterial vectors, has also been used in tumor treatment therapies [85].

DNA vaccines have also been carried by live bacterial vectors [88], [89]. The process of transfection of mammalian cells with DNA carried by LBVs (termed bactofection) has been used as a vaccination strategy by several researchers [90], [91], [92], [93], [94], [95].

Immunization with plasmid DNA carried by some bacteria, especially enteroinvasive species such as *Shigella flexneri*, *Salmonella spp.*, *Yersinia*

enterocolitica and *Listeria monocytogenes*, has shown good results [96]. These vectors direct the DNA vaccine to mucosal surfaces, and the antigens encoded by the plasmids are expressed, processed and presented by APCs, especially dendritic cells. Activation of CD8+ T cells via MHC class I antigen presentation occurs according to this mechanism [96]. In this process, the release of plasmid DNA into the host cell cytosol occurs more effectively after lysis of the bacterial vector in the cytoplasm or in the phagosome [88], [97], [98]. Following release, the DNA should proceed to the cell nucleus to be transcribed. An alternative route that does not require insertion of DNA into the cell nucleus is the delivery of functional mRNA molecules [99].

LBVs and cancer vaccines

A new application of bacterial vectors is their use for the development of vaccines against various types of tumor, such as melanoma and cancers of the prostate, breast, kidney and cervix [100]. Tumor antigens and viral antigens associated with oncogenesis (such as the human papilloma virus) can be carried by bacterial vectors for vaccination and/or therapeutic purposes. In addition to carrying the tumor-associated antigens (TAA) in the form of recombinant proteins, the bacterial vectors have also been used to deliver DNA molecules encoding these antigens.

The immunotherapeutic use of these vectors exploits their intrinsic immunostimulating properties to try to circumvent a major obstacle in tumor immunotherapy, which is the common tendency of TAA to induce immune tolerance instead of triggering active responses of T cells. This feature is related to the initial presentation of these antigens to the immune system by tumor cells, without the presence of co-stimulatory molecules [101]. A strong response of the innate immunity against bacterial vectors is elicited, causing the stimulation of adaptive immunity in order to break the pattern of tolerance against the TAA [100].

The vast majority of published research on vaccines used against tumors in mouse models of cancer has employed attenuated strains of *S. typhimurium*, due to the ability of these bacteria to infect and survive within antigen-presenting cells [100]. Several studies have also been undertaken using *Listeria* to deliver TAA. In this case, the antigen is usually expressed fused to virulence factors LLO or ActA, which

possess motif sequences rich in proline, glutamic acid, serine and threonine residues (PEST domains), flanked by clusters containing positively charged residues that direct the fused proteins to proteosomes for degradation and presentation of peptides generated via MHC I [102]. Using this strategy in studies with the E7 antigen of HPV-16 in mice, Sewell *et al.* (2004) [103] showed that regression of tumors was more pronounced when the antigen was fused to a fragment containing the LLO PEST domain. In 2009, this bacterial vector (*L. monocytogenes* expressing the E7 antigen fused to a fragment of listeriolysin O - Lm-LLO-E7) was used in a safety study (Phase I) in patients with advanced carcinoma of the cervix, constituting the first clinical use of a live attenuated *Listeria* vaccine and demonstrating their safety for human use [104].

The association of DNA molecules encoding cytokines as a strategy to increase the immune response against the TAA in LBVs, and then against cancer cells, has also been reported [85], [105].

The Type III secretion system is another tool used to develop anti-cancer vaccines employing LBVs, as this system enables introduction of the tumor antigen directly into the host cell, allowing the formation of an immune response mediated by cytotoxic cells [52], [62], [106], [107].

Vector priming

There are continuing concerns regarding reuse of the same bacterial vector to deliver different antigens to the same patient, and conflicting results have been reported. The difficulty is that an immune response mounted against the vector itself in a first immunization can suppress or mask the expected response against the antigen delivered in a second immunization.

Studies conducted by Bao and Clements (1991) [108] indicated that the immunological use of a particular strain did not hinder an immune response against a heterologous antigen carried by either the same strain or another immunologically related strain. On the other hand, according to Gahan *et al.* (2008) [109], a prior exposure to *Salmonella* significantly decreased the ability of this vector to survive in the host cells, compromising the effectiveness of the vaccine. According to these authors, this negative effect did not diminish with time, and the same vector might not be suitable for delivery of multiple doses of the same vaccine.

According to studies by Domenech *et al.* (2007) [110], a second immunization using the same *Salmonella* vector reduced the period of maintenance of these bacteria due to prior acquired immunity against the strain, and consequently led to a low immune response against the antigen delivered by this vector. However, in the case of vectors based on *Salmonella*, these researchers demonstrated that the strategy of heterologous prime-boost using different strains of *Salmonella* could be used effectively to circumvent this limitation [111]. Nonetheless, according to Vindurampulle and Attridge (2003) [112] the impact of prior immunity to the vector depends on the strain of *Salmonella* used, as well as the nature of the antigen delivered.

Concerning the use of *Listeria* as a vector, there is evidence to suggest that prior exposure of an organism to this bacterium may not affect subsequent booster treatments [113], [114]. Despite faster clearance in animals that had experienced prior exposure to the vector, the vaccines were capable of stimulating functional T cells and protecting the animals from the challenge. These observations suggested that individuals previously exposed to *Listeria* could still benefit from vaccination using this vector [115]. Similar results were described by Leong *et al.* (2009) [116], after testing in humans.

CONCLUSIONS

Viewed as a whole, the research field of live bacterial vectors (LBVs) has shown significant progress over the past two decades, and several vaccines have been evaluated or are undergoing clinical trials for use in human and veterinary health. New vectors, expression systems and immunization strategies have gradually increased the potential of vaccines developed using this antigen delivery platform.

The viability of LBV vaccine production is favored by the advantageous characteristics of this class of vaccine, as well as by its potentially lower production costs, since complex purification steps are not needed and adjuvants are avoided, in contrast to other recombinant vaccine technologies. Amongst other favorable points is the ability to use the mucosal route, which simplifies vaccine administration and promotes a special type of local immunity. This is a highly attractive feature of this class of vaccines, especially for mass vaccination programs in both developed and developing countries. However, research efforts still need to address aspects that

have so far not been adequately resolved, such as the development of optimal conditions for the cultivation of the vectors. Even for those systems that have been most intensively studied, such as *Salmonella*, there is a lack of information in the scientific literature concerning cultivation strategies at high cell density.

Finally, the successful development of this vaccine delivery technique, whose applications include the transport of cytokines, modulation of the immune response and delivery of DNA vaccines to the interior of antigen-presenting cells, and which also provides new options to combat tumors using LBVs as therapeutic vaccine vectors, should encourage research efforts to further improve the system, which is expected to be an important player in a new generation of vaccines in the near future.

REFERENCES

- [1] Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S *et al.* Oral immunization with a *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocytes against HPV16 E7. *Vaccine* 2010;**28**:2810–7.
- [2] Jiang S, Rasmussen RA, Nolan KM, Frankel FR, Lieberman J, McClure HM, *et al.* Live attenuated *Listeria monocytogenes* expressing HIV Gag: Immunogenicity in rhesus monkeys. *Vaccine* 2007;**25**:7470–9.
- [3] Feng Y, Wang S, Luo F, Ruan Y, Kang L, Xiang X, *et al.* A novel recombinant bacterial vaccine strain expressing dual viral antigens induces multiple immune responses to the Gag and gp120 proteins of HIV-1 in immunized mice. *Antiviral Res* 2008;**80**:272–9.
- [4] Yang H, Cao S, Huang X, Liu J, Tang Y, Wen X. Intra-gastric administration of attenuated *Salmonella typhimurium* harbouring transmissible gastroenteritis virus (TGEV) DNA vaccine induced specific antibody production. *Vaccine* 2009;**27**:5035–40.

- [5] Pacheco LGC, Zucconi E, Mati VLT, Garcia RM, Miyoshi A, Oliveira SC, *et al.* Oral administration of a live Aro attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis. *Acta Tropica* 2005;**95**:132–42.
- [6] Ramasamy R, Yasawardena S, Zomer A, Venema G, Kok J, Leenhouts K. Immunogenicity of a malaria parasite antigen displayed by *Lactococcus lactis* in oral immunizations. *Vaccine* 2006;**24**:3900–8.
- [7] Soussi N, Saklani-Jusforgues H, Colle JH, Milon G, Glaichenhaus N, Goossens PL. Effect of intragastric and intraperitoneal immunisation with attenuated and wild-type LACK-expressing *Listeria monocytogenes* on control of murine *Leishmania major* infection. *Vaccine* 2002;**20**:2702–12.
- [8] Xu DQ, Cisar JO, Osorio M, Wai TT, Kopecko DJ. Core-linked LPS expression of *Shigella dysenteriae* serotype 1 O-antigen in live *Salmonella typhi* vaccine vector Ty21a: Preclinical evidence of immunogenicity and protection. *Vaccine* 2007;**25**:6167–75.
- [9] Keller R, Hilton TD, Rios H, Boedeker EC, Kaper JB. Development of a live oral attaching and effacing *Escherichia coli* vaccine candidate using *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR as antigen vector. *Microb Pathog* 2010;**48**:1–8.
- [10] Pაცეც JD, Nguyen HD, Luiz WB, Ferreira RCC, Sbrogio-Almeida ME, Schuman W, *et al.* Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. *Vaccine* 2007;**25**:4671–80.
- [11] Lee SF, Halperin SA, Wang H, MacArthur A. Oral colonization and immune responses to *Streptococcus gordonii* expressing a pertussis toxin S1 fragment in mice. *FEMS Microbiol Lett* 2002;**208**:175–8.
- [12] Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:197–216.

[13] Shata MT, Stevceva L, Agwale S, Lewis GK, Hone DM. Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Mol Med Today* 2000;**6**:66–71.

[14] Jones B, Pascopella L, Falkow S. Entry of microbes into the host: using M cells to break the mucosal barrier. *Curr Opin Immunol* 1995;**7**:474–8.

[15] Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, *et al.* Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;**2**:361–8.

[16] Flesch IEA, Collins H, Hess J, Kaufmann SHE. Checkpoints in antibacterial immunity. *Res Immunol* 1998;**149**:693–7.

[17] Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* 1992;**60**:1263–7.

[18] Sijts AJ, Villanueva MS, Pamer EG. CTL epitope generation is tightly linked to cellular proteolysis of a *Listeria monocytogenes* antigen. *J Immunol* 1996;**156**:1497–503.

[19] White DW, Wilson RL, Harty JT. CD8+ T cells in intracellular bacterial infections of mice. *67th Forum in Immunology: Immunity to intracellular bacteria* 1996;519–524.

[20] Walker RI. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine* 1994;**12**:387–400.

[21] Gentschev I, Dietrich G, Goebel W. The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol* 2002;**10**:39–45.

[22] Cortes-Perez NG, Lefèvre F, Corthier G, Adel-Patient K, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Vaccine* 2007;**25**:6581–8.

- [23] Ruedl C, Rieser C, Kofler N, Wick G, Wolf H. Humoral and cellular immune responses in the murine respiratory tract following oral immunization with cholera toxin or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Vaccine* 1996;**14**:792–8.
- [24] Hvalbye BK, Aaberge IS, Lovik M, Haneberg B. Intranasal immunization with heat-inactivated *Streptococcus pneumoniae* protects mice against systemic pneumococcal infection. *Infect Immun* 1999;**67**:4320–5.
- [25] Mestecky J, Abraham R, Ogra PL. Common mucosal immune system and strategies for the development of vaccines effective at the mucosal surfaces. In: Ogra PL, Strober W, Mestecky J, McGhee JG, Lamm ME, Bienenstock J, editors. *Handbook of Mucosal Immunology*, New York: Acad. Press; 1994, p. 357–72.
- [26] Bouvet JP, Fischetti VA. Diversity of Antibody-Mediated Immunity at the Mucosal Barrier. *Infect Immun* 1999;**67**:2687–91.
- [27] Cárdenas L, Clements JD. Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. *Clin Microbiol Rev* 1992;**5**:328–42.
- [28] Noriega F, Formal SB, Kotloff KL, Lindberg AA. Vaccines against *Shigella* infections Part II: engineered attenuated mutants of *Shigella* as oral vaccines. In: Levine MM, Dougan G, Kaper JB, Good MF, Liu MA, Nabel GJ, et al, editors. *New Generation Vaccines*, 2nd ed., New York: Marcel Dekker; 1997, p. 853.
- [29] Jensen ER, Shen H, Wettstein FO, Ahmed R, Miller JF. Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle and a probe for studying cell-mediated immunity. *Immunol Rev* 1997;**158**:147–57.
- [30] Hopkins S, Kraehenbuhl JP, Schodel F, Potts A, Peterson D, De Grandi P, et al. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infect Immun* 1995;**63**:3279–86.

- [31] Nardelli-Haefliger D, Kraehenbuhl JP, Curtiss RR, Schodel F, Poots A, Kelly S, *et al.* Oral and rectal immunization of adult female volunteers with a recombinant attenuated *Salmonella typhi* vaccine strain. *Infect Immun* 1996;**64**:5219–24.
- [32] Loch C. Live bacterial vectors for intranasal delivery of protective antigens. *Pharm Sci Technol Today* 2000;**3**:121–128.
- [33] Lintermans P, De Greve H. Live bacterial vectors for mucosal immunization. *Adv Drug Deliv Rev* 1995;**18**:73–89.
- [34] Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Vet J* 2000;**161**:132–64.
- [35] Li Z, Zhao X, Higgins DE, Frankel FR. Conditional lethality yields a new vaccine strain of *Listeria monocytogenes* for the induction of cell-mediated immunity. *Infect Immun* 2005;**73**:5065–73.
- [36] Zhao X, Li Z, Gu B, Frankel FR. Pathogenicity and immunogenicity of a vaccine strain of *Listeria monocytogenes* that relies on a suicide plasmid to supply an essential gene product. *Infect Immun* 2005;**73**:5789–98.
- [37] Brockstedt DG, Giedlin MA, Leong ML, Bahjat KS, Gao Y, Luettkett W *et al.* *Listeria*-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. *Proc Natl Acad Sci* 2004;**101**:13832–7.
- [38] Gerritse K, Posno M, Fasbender MJ, Schellekens MM, Boersma WJA, Claassen E. Mucosal immune responses and systemic immunological memory after oral administration of trinitrophenyl *Lactobacillus* conjugates in mice. In: Imhof B, Benih-Aknin S, Ezine S, editors. *Lymphatic Tissues and in vivo Immune Responses*, New York: Marcel Dekker; 1991, p. 497–504.
- [39] Perdigon M, de Macias MEN, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 1988;**63**:17–23.

- [40] Seegers JFML. *Lactobacilli* as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol* 2002;**20**:508–15.
- [41] Pouwels PH, Leer RJ, Boersma WJA. The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: Development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *J Biotechnol* 1996;**44**:183–92.
- [42] Lee SF. Oral colonization and immune responses to *Streptococcus gordonii*: potential use as a vector to induce antibodies against respiratory pathogens. *Curr Opin Infect Dis* 2003;**16**:231–5.
- [43] Ciabattini A, Pettini E, Arsenijevic S, Pozzi G, Medaglini D. Intranasal immunization with vaccine vector *Streptococcus gordonii* elicits primed CD4+ and CD8+ T cells in the genital and intestinal tracts. *Vaccine* 2010;**28**:1226–33.
- [44] Ryan ET, Butterton JR, Zhang T, Baker MA, Staley SJ, Calderwood SB. Oral immunization with attenuated vaccine strains of *Vibrio cholerae* expressing a dodecapeptide repeat of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein fused to the cholera toxin B subunit induces systemic and mucosal antiamebic and anti-*V. cholerae* antibody responses in mice. *Infect Immun* 1997;**65**:3118–25.
- [45] Matsumoto S, Yukitake H, Kanbara H, Yamada T. Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Secreting Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) Induces Protection against Rodent Malaria Parasite Infection Depending on MSP1-stimulated Interferon γ And Parasite-specific Antibodies. *J Exp Med* 1998;**188**:845–54.
- [46] Santangelo MP, McIntosh D, Bigi F, Armôa GRG, Campos ASD, Ruybal P, *et al.* *Mycobacterium bovis* BCG as a delivery system for the RAP-1 antigen from *Babesia bovis*. *Vaccine* 2007;**25**:1104–13.
- [47] Bastos RG, Borsuk S, Seixas FK, Dellagostin AO. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine* 2009;**27**:6495–503.

- [48] Igwe EI, Rüssmann H, Roggenkamp A, Noll A, Autenrieth IB, Heesemann J. Rational live oral carrier vaccine design by mutating virulence-associated genes of *Yersinia enterocolitica* *Infect Immun* 1999;**67**:5500–7.
- [49] Leibiger R, Niedung K, Geginat G, Heesemann J, Trülsch K. *Yersinia enterocolitica* Yop mutants as oral live carrier vaccines. *Vaccine* 2008;**26**:6664–70.
- [50] Sizemore DR, Branstrom AA, Sadoift JC. Attenuated *Shigella* as a DNA Delivery Vehicle for DNA mediated immunization. *Science* 1995;**270**:299–302.
- [51] Xu F, Hong M, Ulmer JB. Immunogenicity of an HIV-1 gag DNA vaccine carried by attenuated *Shigella*. *Vaccine* 2003;**21**:644–8.
- [52] Epaulard O, Toussaint B, Quenee L, Derouazi M, Bosco N, Villiers C, *et al.* Anti-tumor Immunotherapy via Antigen Delivery from a Live Attenuated Genetically Engineered *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System-Based Vector. *Mol Ther* 2006;**14**:656–61.
- [53] Duc LH, Hong HA, Fairweather N, Ricca E, Cutting SM. Bacterial Spores as Vaccine Vehicles. *Infect Immun* 2003;**71**:2810–8.
- [54] Cayabyab MJ, Hovav AH, Hsu T, Krivulka GR, Lifton MA, Gorgone DA *et al.* Generation of CD8+ T-Cell responses by a recombinant nonpathogenic *Mycobacterium smegmatis* vaccine vector expressing human immunodeficiency virus type I Env. *J Virol* 2006;**80**:1645–52.
- [55] Lu L, Cao HD, Zeng HQ, Wang PL, Wang LJ, Liu SN, *et al.* Recombinant *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 vaccine expressing outer membrane protein 26 kDa antigen affords therapeutic protection against *Helicobacter pylori* infection. *Vaccine* 2009;**27**:972–8.
- [56] Shimoji Y, Oishi E, Muneta Y, Nosaka H, Mori Y. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of

Mycoplasma hyopneumoniae P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine* 2003;**21**:532–7.

[57] Ogawa Y, Oishi E, Muneta Y, Sano A, Hikono H, Shibahara T, *et al.* Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. *Vaccine* 2009;**27**:4543–50.

[58] Muneta Y, Panicker IS, Kanci A , Craick D , Noormohammadi AH, Bean A, Browning GF, Markham PF. Development and immunogenicity of recombinant *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strain ts-11 expressing chicken IFN- γ . *Vaccine* 2008;**26**:5449–54.

[59] Moore RJ, Rothel L, Krywult J, Radford AJ, Lund K, Hodgson ALM. Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. *Vaccine* 2000;**18**:487–97.

[60] Kaufmann SHE, Hess J. Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development. *Immunol Lett* 1999;**65**:81–4.

[61] Spreng S, Dietrich G, Goebel W, Gentschev I. The *Escherichia coli* haemolysin secretion apparatus: a potential universal antigen delivery system in gram-negative bacterial vaccine carriers. *Mol Microbiol* 1999;**31**:1596–8.

[62] Russmann H, Shams H, Pobleto F, Fu Y, Galán JE, Donis RO. Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. *Science* 1998;**281**: 565–8.

[63] Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 1999;**284**:1322–8.

[64] Panthel K, Meinel KM, Sevil Domenech VE, Trülzsch K, Rüssmann H. *Salmonella* type III-mediated antigen delivery: a versatile oral vaccination strategy to

induce cellular immunity against infectious agents and tumors. *Int J Med Microbiol* 2008;**298**: 99–103.

[65] Liljeqvist S, Stahl S. Production of subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnol* 1999;**73**:1–33.

[66] Lee SY, Choi JH, Xu Z. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol* 2003;**21**:45–52.

[67] Georgiou G, Stathopoulos C, Daugherty PS, Nayak AR, Iverson BL, Curtiss 3rd R. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nature Biotechnol* 1997;**15**:29–34.

[68] Cheminay C, Hensel M. Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *Int J Med Microbiol* 2008;**298**:87–98.

[69] Kotton CN, Hohmann EL. Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen display. *Infect Immun* 2004;**72**:5535–47.

[70] Buddenborg C, Daudel D, Liebrecht S, Greune L, Humberg V, Schmidt MA. Development of a tripartite vector system for live oral immunization using a Gram-negative probiotic carrier. *Int J Med Microbiol* 2008;**298**:105–14.

[71] Leenhouts K, Buist G, Kok J. Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999;**76**:367–76.

[72] Medina E, Paglia P, Rohde M, Colombo MP, Guzmán CA. Modulation of host immune responses stimulated by *Salmonella* vaccine carrier strains by using different promoters to drive the expression of the recombinant antigen. *Eur J Immunol* 2000;**30**:768–77.

- [73] Miller VL, Beer KB, Loomis WP, Olson JA, Miller SI. An unusual pagC::TnphoA mutation leads to an invasion- and virulence-defective phenotype in *Salmonellae*. *Infect Immun* 1992;**60**:3763–70.
- [74] Dunstan SJ, Simmons CP, Strugnell RA. Use of *In Vivo*-Regulated Promoters To Deliver Antigens from Attenuated *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *Infect Immun* 1999;**67**:5133–41.
- [75] Roberts M, Li J, Bacon A, Chatfield S. Oral vaccination against tetanus: comparison of the immunogenicities of *Salmonella* strains expressing fragment C from the nirB and htrA promoters. *Infect Immun* 1998;**66**:3080–7.
- [76] Oxer MD, Bentley CM, Doyle JG, Peakman TC, Charles IG, Makoff AJ. High level heterologous expression in *E. coli* using the anaerobically-activated nirB promoter. *Nucleic Acids Res* 1991;**19**:2889–92.
- [77] McKelvie ND, Stratford R, Wu T, Bellaby T, Aldred E, Hughes NJ, *et al.* Expression of heterologous antigens in *Salmonella Typhimurium* vaccine vectors using the in vivo-inducible, SPI-2 promoter, ssaG. *Vaccine* 2004;**22**:3243–55.
- [78] Bullifent HL, Griffin KF, Jones SM, Yates A, Harrington L, Titball RW. Antibody responses to *Yersinia pestis* F1-antigen expressed in *Salmonella typhimurium aroA* from in vivo-inducible promoters. *Vaccine* 2000;**18**:2668–76.
- [79] Garmory HS, Titball RW, Brown KA, Bennett AM. Construction and evaluation of a eukaryotic expression plasmid for stable delivery using attenuated *Salmonella*. *Microb Pathog* 2003;**34**:115–9.
- [80] Weiss S. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian hosts by attenuated *Salmonella* spp. *Int J Med Microbiol* 2003;**293**:95–106.
- [81] Ferreira LCS, Ferreira RCC, Schumann W. *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. *Ann Braz Acad Sci* 2005;**77**:1–12.

[82] Zhou Z, Xia H, Hu X, Huang Y, Li Y, Li L, *et al.* Oral administration of a *Bacillus subtilis* spore-based vaccine expressing *Clonorchis sinensis* tegumental protein 22.3 kDa confers protection against *Clonorchis sinensis*. *Vaccine* 2008;**26**:1817-25.

[83] Uyen NQ, Hong HA, Cutting SM. Enhanced immunization and expression strategies using bacterial spores as heat-stable vaccine delivery vehicles. *Vaccine* 2007;**25**:356–65.

[84] Bermúdez-Humarán LG, Cortes-Perez NG, Lefevre F, Guimaraes V, Rabot S, Alcocer-Gonzalez JM *et al.* A novel mucosal vaccine based on live lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol* 2005;**175**:7297–302.

[85] Rosenkranz CD, Chiara D, Agorio C, Baz A, Pasetti MF, Schreiber F, *et al.* Towards new immunotherapies: targeting recombinant cytokines to the immune system using live attenuated *Salmonella*. *Vaccine* 2003;**21**:798–801.

[86] al-Ramadi BK, Adeghate E, Mustafa N, Ponery AS, Fernandez-Cabezudo MJ. Cytokine expression by attenuated intracellular bacteria regulates the immune response to infection: the *Salmonella* model. *Mol Immunol* 2001;**38**:931–40.

[87] Xu D, Mcorley SJ, Tetley L, Chatfield S, Dougan G, Chan WL, *et al.* Protective effect on *Leishmania major* infection of migration inhibitory factor, TNF- α , and IFN- γ administered orally via attenuated *Salmonella typhimurium*. *J Immunol* 1998;**160**:1285–9.

[88] Grillot-Courvalin C, Goussard S, Huetz F, Ojcius DM, Courvalin P. Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. *Nature Biotechnol* 1998;**16**:862–6.

[89] Loessner EJ, Donnet A, Blum S. Bacteria-mediated DNA transfer in gene therapy and vaccination. *Expert Opin Biol Ther* 2004;**4**:157–68.

- [90] Vecino WH, Quanquin NM, Martinez-Sobrido L, Fernandez-Sesma A, Garcia-Sastre A, Jacobs Jr WR, *et al.* Mucosal immunization with attenuated *Shigella flexneri* harboring an influenza hemagglutinin DNA vaccine protects mice against a lethal influenza challenge. *Virology* 2004;**325**:192–9.
- [91] Bauer H, Darji A, Chakraborty T, Weiss S. *Salmonella*-mediated oral DNA vaccination using stabilized eukaryotic expression plasmids. *Gene Ther* 2005;**12**:364–72.
- [92] Darji A, Zur LS, Garbe AI, Chakraborty T, Weiss S. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;**27**:341–9.
- [93] Dietrich G, Bubert A, Gentschev I, Sokolovic Z, Simm A, Catic A, *et al.* Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat Biotechnol* 1998;**16**:181–5.
- [94] Pasetti MF, Anderson RJ, Noriega FR, Levine MM, Sztein MB. Attenuated Δ *guaBA* *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 915 as a live vector utilizing prokaryotic or eukaryotic expression systems to deliver foreign antigens and elicit immune responses. *Clin Immunol* 1999;**92**:76–89.
- [95] Guimarães VD, Gabriel JE, Lefèvre F, Cabanes D, Gruss A, Cossart P, *et al.* Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes Infect* 2005;**7**:836–44.
- [96] Schoen C, Stritzker J, Goebel W, Pilgrim S. Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int J Med Microbiol* 2004;**294**:319–35.
- [97] Jain V, Mekalanos JJ. Use of lambda phage S and R gene products in an inducible lysis system for *Vibrio cholerae* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium based DNA vaccine delivery systems. *Infect Immun* 2000;**68**:986–9.

[98] Pilgrim S, Stritzker J, Schoen C, Kolb-Maurer A, Geginat G, Loessner MJ, *et al.* Bactofection of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: Improvement and mechanism of DNA delivery. *Gene Ther* 2003;**10**:2036–45.

[99] Schoen C, Kolb-Maurer A, Geginat G, Löffler D, Bergmann B, Stritzker J, *et al.* Bacterial delivery of functional messenger RNA to mammalian cells. *Cell Microbiol* 2005;**7**:709–24.

[100] Paterson Y, Guirnalda PD, Wood LM. *Listeria* and *Salmonella* bacterial vectors of tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. *Semin Immunol* 2010;**22**:183–9.

[101] Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 2003;**21**:807–39.

[102] Wood LM, Guirnalda PD, Seavey MM, Paterson Y. Cancer immunotherapy using *Listeria monocytogenes* and listerial virulence factors. *Immunol Res* 2008;**42**:233–45.

[103] Sewell DA, Shahabi V, Gunn GR III, Pan Z-K, Dominiacki ME, Paterson Y. Recombinant *Listeria* vaccines containing PEST sequences are potent immune adjuvants for the tumor associated antigen human papillomavirus-16 E7. *Cancer Res* 2004;**64**:8821–5.

[104] Maciag PC, Radulovic S, Rothman J. The first clinical use of a live-attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine: A Phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix. *Vaccine* 2009;**27**:3975–83.

[105] Luo Y, Zhou H, Mizutani M, Mizutani N, Reisfeld RA, Xiang R. Transcription factor Fos-related antigen 1 is an effective target for a breast cancer vaccine. *Proc Natl Acad Sci* 2003;**100**:8850–5.

[106] Nishikawa H, Sato E, Briones G, Chen LM, Matsuo M, Nagata Y, *et al.* In vivo antigen delivery by a *Salmonella typhimurium* type III secretion system for therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest* 2006;**116**:1946–54.

[107] Husseiny MI, Wartha F, Hensel M. Recombinant vaccines based on translocated effector proteins of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Vaccine* 2007;**25**:185–93.

[108] Bao JX, Clements JD. Prior immunologic experience potentiates the subsequent antibody response when *Salmonella* strains are used as vaccine carriers. *Infect Immun* 1991;**59**:3841–5.

[109] Gahan ME, Webster DE, Wijburg OLC, Wesselingh SL, Strugnell RA. Impact of prior immunological exposure on vaccine delivery by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Vaccine* 2008;**26**:6212–20.

[110] Domenech VES, Panthel K, Meinel KM, Winter S, Rüssmann HR. Pre-existing anti-*Salmonella* vector immunity prevents the development of protective antigen-specific CD8 T-cell frequencies against murine listeriosis. *Microbes Infect* 2007;**9**:1447–53.

[111] Domenech VES, Panthel K, Winter S, Rüssmann HR. Heterologous prime-boost immunizations with different *Salmonella* serovars for enhanced antigen-specific CD8 T-cell induction. *Vaccine* 2008;**26**:1879–86.

[112] Vindurampulle CJ, Attridge SR. Impact of Vector Priming on the Immunogenicity of Recombinant *Salmonella* Vaccines. *Infect Immun* 2003;**71**:287–97.

[113] Starks H, Bruhn KW, Shen H, Barry RA, Dubensky TW, Brockstedt D, *et al.* *Listeria monocytogenes* as a vaccine vector: virulence attenuation or existing antivector immunity does not diminish therapeutic efficacy, *J Immunol* 2004;**173**:420–7.

[114] Stevens R, Lavoy A, Nordone S, Burkhard M, Dean GA. Pre-existing immunity to pathogenic *Listeria monocytogenes* does not prevent induction of immune responses to feline immunodeficiency virus by a novel recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine. *Vaccine* 2005;**23**:1479–90.

[115] Bruhn KW, Craft N, Miller JF. *Listeria* as a vaccine vector. *Microbes Infect* 2007;**9**:1226–35.

[116] Leong ML, Hampl J, Liu W, Mathur S, Bahjat KS, Lockett W, *et al.* Impact of preexisting vector-specific immunity on vaccine potency: characterization of *Listeria monocytogenes*-specific humoral and cellular immunity in humans and modeling studies using recombinant vaccines in mice. *Infect Immun* 2009;**77**:3958–68.

Seção 3.4 – Clonagem em *Salmonella typhimurium* e caracterização da linhagem vacinal

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Microrganismos

Escherichia coli DH5 α (Novagen) – utilizada para os procedimentos de clonagem e propagação de plasmídeos. Linhagem doada pelo Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva – Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos- SP.

Escherichia coli XL1-blue (Stratagene) – utilizada para testes de expressão da proteína rSpaA fusionada ao sinal de secreção da alfa-hemolisina. Linhagem doada pela Profa. Dulce Helena Ferreira de Souza – Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.

Salmonella typhimurium SL7207 – linhagem atenuada no gene *aroA* e utilizada como veículo vacinal nos experimentos com camundongos para expressão da proteína rSpaA *in vivo*. Doada pelo Dr. Ivaylo Gentshev – Universität Würzburg, Alemanha.

Salmonella typhimurium SL4213 – linhagem deficiente no sistema de restrição de DNA exógeno e proficiente no sistema de modificação (r⁻, m⁺). Foi utilizada como linhagem intermediária para a passagem dos plasmídeos recuperados de células de *E. coli* DH5 α para a linhagem de *Salmonella* vacinal (*S. typhimurium* SL7207). A cepa foi cedida pela Dra. Elizabeth A. Martins – Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, São Paulo-SP.

3.1.2 Clonagem do fragmento *spaA* no vetor de expressão pMOhly1

Apenas parte da região codificadora do gene *spaA*, descrita como sendo uma região antigênica por vários autores (IMADA *et al.*, 1999; SHIMOJI *et al.*, 1999) foi utilizada para a clonagem no vetor pMOhly1, a partir de clone recombinante previamente obtido em vetor pGEM (artigo submetido para *Current Microbiology* Seção 3.1).

3.1.2.1 Estratégia de clonagem: desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) e adaptadores

O vetor pMOhly1, construído e doado pelo professor Ivaylo Gentshev (Würzburg Universität, Alemanha – Gentshev *et al*, 1996), apresenta um sítio único de clonagem *NsiI* (Figura 2.2b). O fato da seqüência de bases ATGCAT, reconhecida pela enzima de restrição *NsiI*, estar presente internamente no fragmento *spaA* a ser clonado (Figura 3.1) foi o motivo da não utilização dessa enzima, pois isto acarretaria na fragmentação do próprio inserto durante o processo de clonagem.

Figura 3.1 – Seqüência do gene *spaA* de *E. rhusiopathiae* linhagem Fujisawa disponível na base de dados DDBJ/EMBL/GenBank sob número de acesso AB019124

```

ATGAAAAGAAAAACACCTATTTCCGAAAGTAAGTCTTATGTCTGTGCTTACTTTTAAACAGCAATGCC
ACTACAAACAGCTTTTGTCTGATTCGACAGATATTTCTGTGATTCCACTAATCGGTGAACAAGTTGGAT
TGCTCCCAGTTTTACCTGGGACAGGGGTACATGCTCAGGAATACAACAAAATGACTGATGCTTATATT
GAAAAATTGGTATCTCTAATTAATCAAAAAGTGAAGCCGTTTCTTATAAATGAGCCAAAGGGGTACCA
AAGTTTCGAAGCAGTGAATGAAGAGATTAACCTCGATTGTAAGTGAACCTAAAAATGAAGGAATGAGTC
TTCAAAACATTACCATATGTTTAAACAAAGCATCCAAAACCTAGCAACTAGAATCGGCTACAGAAGT
TTTATGCAGGATGCTATGTATCTTGAAAATTTTGAAAGATTAACGATTCCCTGAACCTGATGAAGCATA
CGTTGATTTACTCGTGAATTACGAGGTGAAACACCGTATTTTAGTAAAAATATGAAGGTAAGTTAAAG
GTAGAGCTCCCTTAGAAGCATTTATAGTTCCCTCTAAGAGATAGAATTCGTAGTATGAATGAAATTGCT
GCAGAAGTAAATTATTTACCTGAAGCGCATGAGGATTTCTTAGTTTTAGATTCAAGCGAGTATAATGA
CAAATAAATAATATCAACTTTGCTTTGGGTCTAGGGGTGAGGAGTTTATTGACTATAACCGGCTCG
AAAATATGATGGAAAAAGAACTTCATCCACTGTATCTTGAACCTTTATGCTATGCGGAGAAATCGCCAA
ATTCAAGTTGTAAGAGATGTATATCCAACTTGGAAACGTGCGAACGCGGTTGTTGAATCCTTAAAGAC
AATTAAGATATAAAACAAAGAGGGGAAAGAACTACAGGAACCTTCTTGAAATTTATATCCAAAGAAGTG
GAGATGTTGAAAACAGATGTACTCCAACGATTTATTGGAAAATATCAATCAGTAGTTGATGAAGAA
AAAAATAAACTTCAAGATTATTTAGAATCAGATATTTTGATTTCATATAGTGTGGATGGCGAGAAAAT
AAGAAATAAAGAAATTACACTCATCAATAGAGATGCATACTTATCTATGATTTACAGAGCTCAATCGA
TTTCGGAATTAAGACGATTCGTGCAGATTTAGAATCACTTGTCAAATCATTCAAAATGAAGAAAGT
GACTCTAAAGTAGAGCCTGAAAGTCCCGTTAAAGTAGAAAAACCAGTTGATGAAGAAAAACCTAAAGA
TCAAAAGAAGCTAGTTGATCAATCAAAACCCGAATCGAATTCAAAAGAAGGGTGGATTAAGAAAGATA
ATAAGTGGTTCTATATTGAGAAATCAGGTGGAATGGCAACAGGTTGGAAGAAGGTAGCAGACAAATGG
TACTACCTCGATAATACGGGTGCTATAGTTACGGGTTGGAAGAAGGTAGCAAACAAATGGTACTATCT
TGAAAATCAGGTGCGATGGCAACAGGATGGAAGAAAGTATCAAACAAGTGGTACTACCTTGAAAACCTCAGGTGCGATGGCAAC
CAGGTGCAATGGCAACAGGATGGAAGAAAGTATCAAACAAGTGGTACTACCTTGAAAATTCAGGCGCA
ATGGCTACAGGATGGAAAAGGTAGCAAACAAATGGTACTACCTTGAAAACCTCAGGTGCGATGGCAAC
AGGATGGAAGAAAGTATCGAACAAGTGGTACTACCTTGAAAACCTCAGGCGCAATGGCTACAGGATGGA
AAAAGGTAGCAAACAAATGGTACTACCTTGATAAATCAGGAATGATGGTTACAGGTTCAAAATCTATT
GATGGTAAAAAGTATGCATTTAAGAACGATGGAAGTTTAAATAG

```

Legenda:

Região cinza: fragmento clonado (1026 pb)

ATGCAT: sítio *NsiI* presente na seqüência clonada do gene *spaA*

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Dessa forma, houve a necessidade de acrescentar uma etapa prévia de tratamento do plasmídeo, onde foram adicionados adaptadores com sítios de restrição *NotI* para criar um novo sítio de clonagem adjacente ao sítio *NsiI*. Para isso, o vetor foi linearizado com a enzima *NsiI* e em seguida foi feita a ligação de adaptadores para a inserção do novo sítio de restrição *NotI*, inexistente na seqüência do gene *spaA* e no vetor pMOhly1.

As moléculas adaptadoras são oligonucleotídeos de fita simples auto-complementares cuja extremidade 3' se hibridiza com as extremidades protuberantes do DNA linearizado onde devem se ligar, e na extremidade 5' possuem o novo sítio de restrição que se quer introduzir.

A etapa de ligação dos adaptadores no vetor acarreta a ligação de vários adaptadores *in tandem*, ou seja, em seqüência (no caso de adaptadores 5' fosforilados). Tais adaptadores em excesso são removidos após digestão com a enzima de restrição em questão, possibilitando que o vetor esteja pronto para receber o inserto, com apenas uma molécula do adaptador inserida em cada uma das extremidades. O fragmento a ser inserido neste vetor é amplificado a partir de oligonucleotídeos iniciadores que contêm o sítio de restrição a ser introduzido nas extremidades do inserto durante a sua amplificação por PCR, sítio este compatível com as extremidades do vetor onde será clonado. O Quadro 3.1 mostra as moléculas adaptadoras desenhadas para a criação de sítios para a enzima *NotI* no vetor pMOhly1, além dos oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do fragmento *spaA* a ser clonado. A Figura 3.2 esquematiza o procedimento proposto.

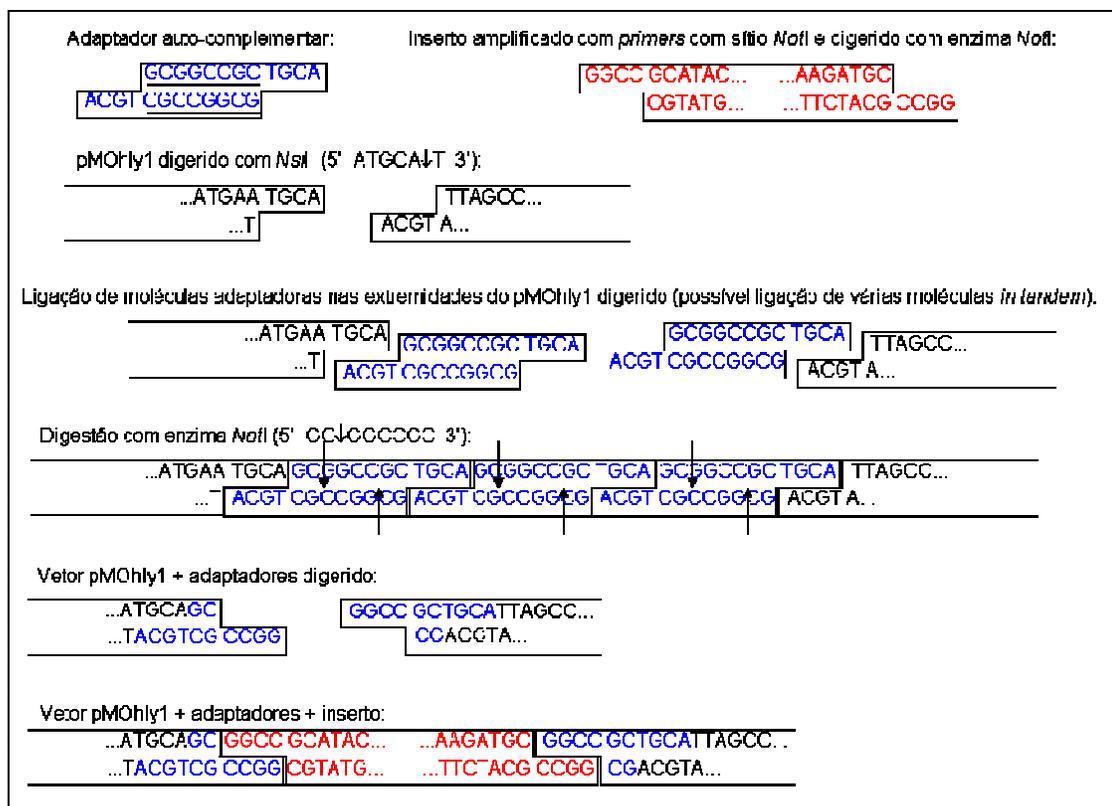
Quadro 3.1 – Adaptadores e oligonucleotídeos iniciadores desenhados para clonagem do fragmento *spaA* no vetor pMOhly1

Oligonucleotídeo	Seqüência (5'→3')*	Endonuclease (Sítio de restrição)
<i>Adapt SpaA_NotI</i>	<u>GCGGCCGCTGCA</u>	<i>NotI</i> (<u>GC↓GGCCGC</u>)
<i>Primer direto</i> (<i>For SpaA_NotI</i>)	CAGCGGCCGCAT ACCAAAGTTTCGAAGC *	<i>NotI</i> (<u>GC↓GGCCGC</u>)
<i>Primer reverso</i> (<i>Rev SpaA_NotI</i>)	CAGCGGCCGCAT CTTTAGGTTTTCTTC *	<i>NotI</i> (<u>GC↓GGCCGC</u>)

* seqüências em negrito nos oligonucleotídeos iniciadores correspondem às extremidades 5' (*primer forward*) e 3' complementar (*primer reverse*) do fragmento amplificado de *spaA* correspondente à região destacada (em cinza) na Figura 3.1; a base A em itálico no *primer Forward* foi adicionada a fim de manter o quadro de leitura (*frame*); as seqüências sublinhadas correspondem aos sítios reconhecidos pela enzima *NotI*

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Figura 3.2 – Esquema proposto para a criação de um sítio *NotI* no vetor pMOhly1 a ser utilizado na clonagem do fragmento *spaA*



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

3.1.2.2 Amplificação por PCR do fragmento de *spaA* com sítios de restrição *NotI*

A amplificação deste fragmento foi feita a partir da construção pGEM-T_ *spaA*, previamente preparada a partir da amplificação deste gene usando o DNA genômico de *E. rhusiopathiae* como molde (descrita na Seção 3.1).

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores direto e reverso (*For SpaA_NotI* e *Rev SpaA_NotI*), de forma que fossem adicionados sítios de restrição para a enzima *NotI* nas extremidades do fragmento amplificado (Quadro 3.1).

Foi realizada reação de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em termociclador (Px2 Thermal Cycler – Thermo) tendo como molde a construção pGEM-T_ *spaA* para a amplificação do fragmento *spaA*. Cada reação, para volume total de 50 μ L, continha:

- pGEM-T_ *spaA* (molde): 3 μ L (concentração ~ 50 ng/ μ L)
- tampão (Tris-HCl 750 mM, (NH₄)₂SO₄ 200 mM, Tween 20 0,1%, pH 8,8): 5 μ L
- MgCl₂ 25 mM: 4 μ L
- oligonucleotídeos direto e reverso 10 μ M (cada): 1 μ L de cada
- dNTPs 10 mM: 1 μ L
- água: 34 μ L
- *Taq* DNA polimerase 5 U/ μ L (Fermentas): 1 μ L

Após desnaturação inicial da dupla fita do DNA molde por 5 minutos a 94°C, foram realizados 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 94°C, hibridização dos oligonucleotídeos com a fita molde a 60°C por 1 minuto, e extensão das novas fitas de DNA a 72°C por 3 minutos. A extensão final foi feita a 72°C por 10 minutos.

A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8 %, sendo o fragmento amplificado purificado a partir do gel utilizando-se o *kit* Wizard SV (Promega).

3.1.2.3 Clonagem do fragmento *spaA*_(*NotI*) no vetor de propagação pGEM-T

O produto purificado da reação de PCR foi utilizado para ligação no vetor de propagação pGEM-T. Para a reação de ligação foram usados 50 ng do plasmídeo,

150 ng do produto amplificado purificado, 1 µL da enzima T4 DNA ligase 3 U/µL (enzima do *kit* do vetor pGEM-T), 5 µL do tampão de reação (Tris-HCl 60 mM, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM, PEG 10 %, pH 7,8) em um volume total de 10 µL. A reação de ligação foi mantida a 4°C por 16 horas.

O produto da ligação (10 µL) foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH5α (200µL), previamente tratadas com cloreto de cálcio 0,1 M (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) para se tornarem competentes.

A transformação foi feita por choque térmico (42°C por 90 segundos e incubação no gelo por 2 minutos). Após o choque térmico foram adicionados 800 µL de meio SOC (triptona 20 g/L, ext. levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, glicose 20 mM) e a cultura foi incubada a 37°C durante 60 minutos. Após esse período, 200 µL da cultura foram plaqueados em meio LB ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina, com 100 µL de IPTG (isopropil-β-D-tio-galactosídeo) 100 mM e 20 µL de XGal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) 50 mg/mL espalhados previamente na superfície da placa.

A placa da transformação foi incubada a 37°C durante 16 horas para crescimento das colônias. As possíveis colônias recombinantes (colônias brancas) foram distinguidas visualmente das colônias não recombinantes (azuis).

A confirmação da presença do inserto e sua caracterização no clone recombinante foram feitas por PCR de colônia, digestão do plasmídeo recombinante com a enzima de restrição *NotI* e seqüenciamento, de acordo com os protocolos descritos em SAMBROOK e RUSSEL (2001).

Todos os procedimentos de seqüenciamento de DNA relatados neste trabalho foram realizados no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, coordenado pelo Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva.

3.1.2.4 Clonagem do fragmento *spaA* (*NotI*) no vetor de expressão pMOhly1

3.1.2.4.1 Preparação do inserto

O inserto para clonagem foi preparado a partir da digestão do plasmídeo recombinante (construção pGEM_*spaA* (*NotI*)), obtido por mini-prep, com a enzima de restrição *NotI* (Fermentas). Para isso, 2,5 µg de DNA [mini-preparação

pGEM_*spaA*_(*NotI*)] foram clivados por 1,0 µL da enzima *NotI* (linha FastDigest – Fermentas) juntamente com 5 µL de tampão FastDigest 10x (Fermentas) em um volume total de reação de 50 µL, a 37° por 2 horas. Após esse período, a enzima foi inativada a 80°C por 5 minutos e o inserto digerido foi purificado a partir de um gel de agarose 0,8% com o uso do *kit* Invisorb Fragment CleanUp (Invitex).

3.1.2.4.2 Preparação do vetor pMOhly1

Inicialmente foi feita a extração plasmidial (*kit* GeneJet Plasmid Miniprep – Fermentas) de 3 mL de uma cultura crescida por 16 horas a 37°C e agitação de 250 rpm de células de *E. coli* DH5α transformadas com o vetor pMOhly1.

Em seguida, 3 µg desse DNA plasmidial foram tratados com 1,0 µL da enzima de restrição *NsiI* (10 U – New England Biolabs) juntamente com 5 µL de tampão NEBuffer3 (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9) em um volume total de reação de 50 µL, a 37°C por uma noite. Após esse período, a enzima foi inativada a 80°C por 20 minutos e o plasmídeo digerido foi recuperado e purificado a partir de um gel de agarose 0,8% com o uso do *kit* Invisorb Fragment CleanUp (Invitex).

A seguir foi feita a ligação dos adaptadores no vetor pMOhly1 digerido com *NsiI*. Para isso, foi realizada uma reação de ligação contendo 150 ng do vetor, 1 µL do adaptador (*Adapt_NotI* 100 µM), 1 µL da enzima T4 DNA ligase (1 U – Invitrogen) e 2 µL do tampão de reação da ligase 5x (250 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (m/v) polietilenoglicol-8000), totalizando um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 4°C por uma noite.

Após esse período, a enzima T4 DNA ligase foi inativada a 65°C por 15 minutos, e foi realizada a digestão do produto da ligação do vetor com o(s) adaptador(es). Essa etapa teve como objetivo remover as moléculas de adaptador ligadas em excesso, de forma que restasse apenas uma molécula (digerida) ligada a cada uma das extremidades do vetor. Para tanto, foi realizada a reação de digestão do produto pMOhly1_adaptador contendo os 10 µL da reação de ligação original, mais 2,5 µL da enzima *NotI* (linha FastDigest – Fermentas), 10 µL do tampão FastDigest 10x (Fermentas) e 80 µL de água Milli-Q autoclavada para completar um volume final de reação de 100 µL. A reação foi incubada por 3,5 horas a 37°C. Ao

término desse período, foi feita a inativação da enzima a 80°C por 5 minutos e o produto da reação de digestão foi purificado a partir de um gel de agarose 0,8 % com o uso do *kit* Invisorb Fragment CleanUp (Invitex).

3.1.2.4.3 Reação de ligação, transformação e confirmação da presença do inserto nos recombinantes

Para a reação de ligação foram usados 25 ng do plasmídeo_adaptador e 125 ng do inserto (item 3.1.2.4.1), 1 µL da enzima T4 DNA ligase 1 U/µL (Invitrogen), 4 µL do tampão de reação 5x (250 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (m/v) polietilenoglicol-8000), totalizando um volume de 20 µL de reação. A mistura reacional foi mantida a 4°C por 16 horas.

O produto da ligação (10 µL) foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH5α (200µL) previamente tratadas com cloreto de cálcio 0,1 M para torná-las competentes (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). A transformação foi feita por choque térmico, como descrito na clonagem do produto de PCR no vetor pGEM-T (item 3.1.2.3) e o plaqueamento foi feito em meio LB ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina.

A placa da transformação foi incubada a 37°C por 16 horas e as colônias resultantes foram analisadas por PCR de colônia para verificar a presença de células recombinantes.

Como será discutido nos resultados, nesta primeira reação de ligação foram obtidas com sucesso colônias carregando o vetor ligado a moléculas de adaptador, porém sem a presença do inserto *spaA*. Foi feita então a propagação de uma destas colônias, extração plasmidial, nova digestão com a enzima de restrição *NotI* e a seguir a reação de ligação com o inserto. Nesta etapa, a reação de digestão foi feita com 1,5 µg de pMOhly1_adaptador, 3 µL de *NotI* (FastDigest – Fermentas) e 6 µL de tampão 10x FastDigest (Fermentas), em um volume total de 60 µL. A reação foi incubada a 37°C por uma noite, e o produto da digestão foi purificado a partir de gel de agarose. A reação de ligação foi feita com 90 ng do vetor digerido (~10000 pb), 25 ng do inserto (~1000 pb), 2 µL do tampão de reação 5x e 1 µL de ligase 1U/ µL (Invitrogen), totalizando 10 µL de reação. Foi feita incubação a 4°C por 16 horas e o produto da reação foi diluído em 90 µL de meio SOC e utilizado para transformar 200µL de células de *E. coli* DH5α competentes, como descrito anteriormente.

Seis das colônias a partir das quais houve amplificação da seqüência de interesse por PCR, foram inoculadas em meio líquido com ampicilina (100 µg/mL) para a extração de DNA plasmidial. A presença do fragmento clonado nestes vetores foi confirmada por clivagem do plasmídeo extraído, usando a mesma enzima de restrição utilizada na clonagem (*NotI*), seguida da análise por eletroforese em gel de agarose, e finalmente pelo seqüenciamento. Para este seqüenciamento foram usados os oligonucleotídeos iniciadores descritos no Quadro 6.2, desenhados para se hibridizar nas regiões 5' (*primer* direto) e 3' (*primer* reverso) dos trechos do gene da hemolisina (*hlyA*) que estão presentes no vetor pMOhly1 (Figura 3.3).

Quadro 3.2 – Oligonucleotídeos iniciadores para o seqüenciamento do inserto clonado no vetor pMOhly1

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' → 3')*
<i>Fow Seq pMO1</i>	CAGTCTGCAAAGCAATCC
<i>Rev Seq pMO1</i>	ACATCGAAGCTACCTGCA

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Figura 3.3 – Seqüência do fragmento do gene da hemolisina (*hlyA*) presente no plasmídeo pMOhly1 e regiões de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores *Fow Seq pMO1* e *Rev Seq pMO1*.

Fragmentos do gene *hlyA* presentes no plasmídeo pMOhly1:

Região de anelamento do *primer Forward*:

5'...
 ATGACAAACAATAAACCCTGCACAAAATTAAGCACACTG**CAGTCTGCAAAGCAATCC**CGCTGCAAATAAATTGCCTCAGCAGG
 ACAAAGCACGAAAG**ATGCA** 3'...

Região de anelamento do *primer Reverse*:

5'...
TTAGCCTATGGAAGTCAGGGTGATCTTAATCCATTAATTAATGAAATCAGCAAAATCATTTCAGC**TGCAGGTAGCTTCGATGT**
 TAAAGAGGAAAGAACTGCAGCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTTCATATGGACGGAACTCAATAACCC
 TGACCACATCAGCATAA 3'...

ATGCAT = Sítio de reconhecimento da enzima de restrição *NsiI*, onde foi inserido o adaptador com sítio de reconhecimento da enzima de restrição *NotI* e o fragmento do gene *spa4*

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Foi feita também a análise da orientação do fragmento *spaA* ligado ao vetor pMOhly1 nas colônias recombinantes através de outra reação de PCR. Nessa segunda reação, foram utilizados o *primer* Direto “*Fow Seq pMO1*” (que se hibridiza com o plasmídeo pMOhly1 na região *upstream* ao sitio de clonagem *NotI*) e o *primer* Reverso “*Rev SpaA_NotI*” (que se hibridiza à região codificadora da extremidade C-terminal da rSpaA). Dessa forma, a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1000 pb, correspondente ao fragmento *spaA* clonado, só poderia ocorrer nos clones com a orientação correta (sentido 5'→3' da fita codificadora do fragmento *spaA*).

A amplificação (com T_m de 40°C e demais condições idênticas às utilizadas nas reações de PCR já descritas) ocorreu a partir do DNA extraído de 1 das 3 colônias analisadas. Esse DNA foi então enviado para seqüenciamento e a clonagem do fragmento *spaA* na orientação correta e no sitio *NotI* do vetor pMOhly1 foi confirmada.

A construção pMOhly1_*spaA* confirmada foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α (para fins de estocagem do plasmídeo) e de *E. coli* XL1-blue para os ensaios de expressão, ambas por choque térmico (segundo o procedimento descrito no item 3.1.2.3).

3.1.3 Ensaio de expressão e secreção da rSpaA em *E. coli* XL1-Blue

Este experimento foi realizado para verificar a produção e exportação da proteína rSpaA para o meio extracelular pelo sistema de secreção da α -hemolisina, utilizando-se a construção pMOhly1_*spaA*.

Inicialmente foram preparados inóculos da linhagem de *E. coli* XL1-Blue sem o DNA recombinante (controle negativo) e de uma colônia transformada com a construção pMOhly1_*spaA*. As células foram incubadas em tubos Falcon contendo 5 mL de meio LB (contendo ampicilina 100 μ g/mL para a linhagem recombinante) a 37°C, 250 rpm, por 8 horas. Em seguida as células foram separadas por centrifugação a 8000g, 4°C por 10 minutos e ressuspendidas em 150 mL de meio de cultivo N-5052 modificado. As tabelas 3.1 e 3.2 trazem a composição deste meio baseado em uma formulação descrita por STUDIER (2005).

O crescimento celular foi acompanhado pela medida da densidade ótica (DO) do caldo e foi interrompido quando foi atingida DO = 1,0. Neste ponto foi feita nova centrifugação (8000g, 4°C por 10 min) e o sobrenadante foi armazenado a -20°C para posterior análise da produção e secreção da rSpaA.

Tabela 3.1 – Meio N-5052 modificado

Nutriente	Concentração (g/L)
Glicose	5,0
Na ₂ HPO ₄ anidro	3,55
KH ₂ PO ₄	3,4
NH ₄ Cl	2,67
Na ₂ SO ₄	0,71
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Solução de metais (Tabela 3.2)	0,2x
Tiamina	4,5 mg/L
<i>Ampicilina</i>	100 mg/L

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Tabela 3.2 – Solução de metais 1000x, para composição do Meio N-5052

Componente	Concentração final (mM)
FeCl ₃	50
CaCl ₂	20
MnCl ₂	10
ZnSO ₄	10
CoCl ₂	2
CuCl ₂	2
NiCl ₂	2
Na ₂ MoO ₄	2
H ₃ BO ₃	2
HCl	60

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

3.1.4 Imunodeteção da proteína rSpaA após cultivo do clone *E. coli* XL1-blue pMOhly1_spA: frações extracelular e intracelular

3.1.4.1 Obtenção de proteínas da fração extracelular

Os volumes de 150 mL de sobrenadante dos cultivos do clone e do controle negativo foram concentrados para 7 mL por filtração em membrana (concentradores Vivaspín 20, GE Healthcare) com tamanho de poro para retenção de proteínas acima de 10 kDa, utilizando-se centrifugações sucessivas de 7800g a temperatura ambiente. As amostras foram transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL e, em seguida, foi feita precipitação das proteínas das amostras utilizando ácido tricloroacético (TCA) seguindo o protocolo descrito a seguir:

- adição de 7 mL de solução de TCA 20 % (m/v) gelada – conc. final de TCA = 10 %;
- agitação (vórtex);
- incubação no gelo por 30 minutos;
- centrifugação a 16000g, 4°C por 10 minutos, e descarte do sobrenadante;
- ressuspensão do pellet em 1 mL de etanol 70 % gelado (lavagem) e transferência para tubo de 1,5 mL;
- centrifugação e descarte do sobrenadante;
- nova lavagem do precipitado com 1 mL de etanol 70 % gelado e transferência para o tubo de 1,5 mL;
- centrifugação e descarte do sobrenadante;
- repetição das etapas de lavagem e centrifugação por mais 2 vezes;
- ressuspensão do pellet final do tubo de 1,5 mL em 100 µL de tampão Laemmli contendo uréia 8 M.

3.1.4.2 Obtenção de proteínas da fração intracelular

Foi feita a preparação da amostra de células do cultivo para analisar a fração intracelular quanto à presença da proteína rSpaA. Para isso, as amostras foram centrifugadas e, após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9 %) de forma que a suspensão final tivesse uma absorbância ($\lambda = 600$ nm) de 3,0 ($\pm 0,1$). Em seguida, 25 µL de tampão de Laemmli

(contendo Tris 0,12 M, glicerol 20 % (v/v), β -mercaptoetanol 10 % (v/v), SDS 4% (m/v), uréia 8 M e azul de bromofenol 0,1 % (m/v)) foram adicionados a 50 μ L de amostra. Após fervura por 10 minutos a 100 °C e centrifugação a 12000 g por 5 minutos, 20 μ L de amostra foram utilizados na análise por SDS-PAGE, juntamente com a fração extracelular descrita acima.

3.1.4.3 Análise dos extratos de proteínas intracelulares e extracelulares

As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e em seguida foi realizado o procedimento de *Western blot* com anticorpos anti-rSpaA para imunodeteção da proteína recombinante nas amostras concentradas do sobrenadante do cultivo do clone *E. coli* XL1-blue pMOhly1_*spaA* e das proteínas celulares. Os procedimentos de SDS-PAGE e *Western blot* foram realizados de acordo com os protocolos descritos na Seção 3.1.

3.1.5 Transformação de *S. typhimurium* com o vetor recombinante pMOhly_*spaA*

Os experimentos de transformação de ambas as linhagens de *Salmonella* utilizadas foram realizados no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan (São Paulo-SP), no laboratório coordenado pela pesquisadora Dra. Elizabeth A. Martins. A linhagem de *S. typhimurium* SL4213 foi gentilmente cedida pela Dra Elizabeth. Os mesmos procedimentos foram utilizados para as linhagens de *S. typhimurium* SL4213 e SL7207.

3.1.5.1 Preparação de estoque de células eletrocompetentes de *S. typhimurium*

Inicialmente foram feitos inóculos de ambas as linhagens em meio 2YT (triptona 16 g/L, extrato de levedura 10 g/L, NaCl 5 g/L), sendo incubados a 37°C e 170 rpm por uma noite. Após essa etapa, alíquotas das culturas foram diluídas em meio fresco de modo a obter densidade ótica (DO_{600nm}) de 0,1, e a partir daí incubadas novamente nas mesmas condições de crescimento até atingirem $DO = 0,4$.

Em seguida, foi feita centrifugação de 80 mL de cada cultura a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 mL de solução de glicerol 10% (v/v). Foi realizada nova centrifugação e essa etapa de lavagem das células (ressuspensão em glicerol seguida de centrifugação) foi repetida mais 4 vezes, com volumes decrescentes de solução de glicerol: 2 lavagens com 10 mL, 1 lavagem com 5 mL e a última lavagem com 1 mL. O *pellet* final foi então ressuspensado em 100 µL de glicerol 10 %, e a suspensão foi armazenada a -80°C em duas alíquotas de 50 µL.

3.1.5.2 *Transformação por eletroporação e confirmação dos clones de S. typhimurium recombinante*

O estoque de células eletrocompetentes foi descongelado em banho de gelo e incubado com aproximadamente 100 ng do DNA de interesse (pMOhly1_ *spaA*). Em seguida, a mistura de células e DNA foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 mm de distância entre os eletrodos e foi feita a descarga do pulso elétrico de 25 µF de capacitância, 2,5 KV e 200 Ohm de resistência (eletroporador Bio-Rad, modelo Gene Pulser). Imediatamente após o pulso, foram adicionados 400 µL de meio SOC à cubeta, e a suspensão foi transferida para um tubo de 1,5 mL, a fim de ser incubada por 1 hora a 37°C e 170 rpm. Após isso, foi feito o plaqueamento de alíquotas de 200 µL da cultura em placas de 2YT ágar com ampicilina 100 µg/mL, que foram então incubadas a 37°C por 16 horas.

Algumas colônias crescidas no meio seletivo foram inoculadas em meio líquido 2YT contendo ampicilina 100 µg/mL e incubadas a 37°C e 170 rpm, por uma noite. Foi feita em seguida a extração plasmidial destas colônias (*kit* Invisorb Spin Plasmid Mini Two – Invitex) e a presença da construção pMOhly1_ *spaA* foi confirmada por PCR.

O mesmo procedimento foi utilizado para as linhagens de *S. typhimurium* SL4213 e SL7207.

3.1.6 Caracterização *in vitro* da linhagem vacinal *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_ *spaA*

A expressão e secreção do antígeno rSpaA, cujo fragmento codificante foi fusionado ao sinal de secreção da alfa-hemolisina, foram avaliadas por *Western blot* do sobrenadante concentrado do cultivo da linhagem recombinante.

3.1.6.1 Curvas de crescimento da linhagem vacinal

O crescimento celular foi acompanhado por leituras de absorbância do caldo de cultivo em comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}) e medidas de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Os cultivos foram realizados a partir da raspagem de células provenientes de criotubos armazenados a -80°C , incubadas em 10 mL de meio 2YT com Ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ a 37°C e agitação de 200 rpm por 16 horas. Em seguida, foram transferidos 2 mL dessa cultura para 2 frascos com 200 mL de meio 2YT com Ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ em Erlenmeyer de 500 mL, e as células foram incubadas a 37°C e agitação de 200 rpm (condição aeróbia) ou sem agitação (condição anaeróbia).

As medidas de concentração celular foram utilizadas para confeccionar uma curva de calibração para os valores de DO e UFC/mL.

Amostras do final dos cultivos foram analisadas por HPLC (como descrito na Seção 3.1.) para avaliar a produção de ácidos orgânicos.

3.1.6.2 Avaliação da manutenção do plasmídeo recombinante

Para estas análises foram feitas diluições sucessivas de uma amostra do final do cultivo na proporção de 1:10 (0,1 mL de suspensão de bactéria para 0,9 mL de solução salina – NaCl 0,9 %) até a concentração desejada (em torno de 1×10^3 UFC/mL).

Em seguida, alíquotas de 0,1 mL da suspensão adequadamente diluída foram plaqueadas em 2YT ágar em pelo menos duas concentrações diferentes, de forma a se obter em torno de 100 colônias na placa (após incubação a 37°C por 16 horas). Destas colônias, setenta e cinco foram repicadas para uma placa de 2YT

ágar e outra de 2YT ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina com o uso de palitos estéreis. Após 16 horas de incubação a 37°C, foi feita a contagem do número de colônias presentes nas placas sem e com antibiótico, para contabilizar a porcentagem de células capazes de crescer no meio com antibiótico, e que, portanto, permaneciam com o plasmídeo em seu interior.

3.1.6.3 *Preparação da amostra do sobrenadante do cultivo da linhagem vacinal para detecção da proteína recombinante*

Ao final dos cultivos foi feita adição de solução de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) na concentração final de 1 mM para inibir a ação de serino-proteases, e o sobrenadante foi separado por centrifugação a 9000 g, por 20 minutos a 4°C, sendo em seguida filtrado em membrana com diâmetro de poro de 0,22 µm.

As proteínas da amostra do sobrenadante foram precipitadas pelo método descrito por CALDWELL e LATTEMANN (2004). Para isso, foram adicionados 25 mL da solução PRMM (pirogalol vermelho 0,05 M, molibdato de sódio 0,16 mM, oxalato de sódio 1,0 mM, ácido succínico 50 mM e metanol 20 % (v/v), pH 2,0) à 25 mL de sobrenadante do cultivo em um tubo Falcon de 50 mL. O pH da mistura foi ajustado para 2,8 e a mesma foi deixada em repouso por 1 hora em temperatura ambiente e a 4°C por uma noite. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10000 g por 1 hora a 4°C, descartou-se o sobrenadante e o material precipitado foi lavado 2 vezes com 1 mL de acetona gelada. O *pellet* foi então ressuspendido em 100 µL de tampão Laemmli 2x e 100 µL de solução saturada de Tris. Por fim, a amostra foi fervida a 95°C por 15 minutos. A amostra resultante foi analisada por *Western blot*, como descrito a seguir.

3.1.6.4 *Western blot*

O ensaio de imunodeteção foi realizado contra amostras do sobrenadante do cultivo da linhagem de *S. typhimurium* SL7207 transformada com o plasmídeo pMOhly1_ *spaA*, e também contra a proteína recombinante purificada, usada como controle positivo do experimento. Utilizou-se o procedimento descrito na Seção 3.1.

3.1.7 Caracterização *in vivo* da linhagem vacinal *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_ *spaA*

Estes experimentos foram realizados sob supervisão da Dra. Maria Elisabete Sbrogio de Almeida (Instituto Butantan, São Paulo, SP) e com a ajuda do técnico Calixto Correia da Silva (Wama Diagnóstica, São Carlos, SP).

3.1.7.1 Capacidade de colonização e invasão

Um grupo de 15 camundongos fêmeas da linhagem Swiss com idade aproximada de 8 semanas foi inoculado por via intragástrica com uma dose de 0,5mL de bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6 seguida de uma dose de $1,0 \times 10^{10}$ UFC da linhagem vacinal *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_ *spaA*. Nos dias 1, 3, 7, 10 e 15 após inoculação, grupos de 3 animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical para coleta do baço e de 5 placas de Peyer por animal em ambiente estéril (fluxo laminar).

Os baços dos animais foram macerados separadamente em homogeneizadores de vidro com 1,0 mL de solução salina NaCl 0,9 %. Em seguida, foi feita diluição seriada das amostras com solução salina (até 1:10 ou 1:100) e alíquotas de 100 μ L das mesmas foram plaqueadas em 2YT ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas para posterior contagem das unidades formadoras de colônias. O mesmo procedimento foi realizado com os conjuntos de 5 placas de Peyer de cada animal, mas o plaqueamento foi feito em 2YT ágar com o antibiótico novobiocina 1,0 μ g/mL.

3.1.7.2 Avaliação da estabilidade do plasmídeo recombinante *in vivo*

A estabilidade segregacional do plasmídeo pMOhly1_ *spaA* carregado pela linhagem vacinal foi avaliada a partir das colônias recuperadas do baço e placas de Peyer dos animais inoculados. Para isso, foi feito repique dessas colônias em placas de 2YT ágar com e sem ampicilina 100 μ L/mL. Após incubação a 37°C por 16 horas foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias em cada condição para estimar a porcentagem de células portadoras do plasmídeo recombinante *in vivo*.

3.1.7.3 Experimentos de imunização e coleta de amostras de soro e fezes

Estes ensaios foram feitos para avaliar a capacidade da linhagem vacinal recombinante *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_*spaA* de induzir resposta imune específica contra o antígeno rSpaA de *E. rhusiopathiae*.

Foram realizados experimentos com 30 camundongos fêmeas da linhagem Swiss com idade aproximada de 8 semanas, divididos em 3 grupos de 10 animais cada. O esquema de vacinação foi composto por 3 doses por via intragástrica com intervalo de 21 dias entre a 1ª e 2ª dose e 14 dias entre a 2ª e 3ª dose. O grupo 1 (G1) foi inoculado apenas com doses de 0,5 mL de bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6. O grupo 2 (G2) recebeu doses de $1,0 \times 10^{10}$ UFC da linhagem vacinal *S. typhimurium* SL7207 não transformada. O grupo 3 (G3) recebeu doses de $1,0 \times 10^{10}$ UFC da linhagem vacinal *S. typhimurium* SL7207 transformada com o plasmídeo recombinante pMOhly1_*spaA*. As inoculações dos grupos 2 e 3 foram sempre precedidas de doses de 0,5 mL de bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6.

Para analisar a produção de anticorpos IgG, amostras de sangue dos animais foram coletadas pela veia retro orbital com pipetas Pasteur estéreis 7 dias após a terceira dose. As amostras foram deixadas em repouso a temperatura ambiente por 1 hora, em seguida a 37°C por 30 minutos e a 4°C por mais 30 minutos. O soro foi separado por centrifugação a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C e transferido para tubos de 1,5 mL com tampa, para armazenamento a -20°C.

Para analisar a produção de anticorpos IgA foi feita a coleta do material fecal dos camundongos imunizados. Para isso, os animais foram transferidos para gaiolas vazias higienizadas e após aproximadamente 1 hora foi feita a coleta das fezes, que foram transferidas para tubos previamente pesados. A massa das amostras coletadas de cada grupo foi determinada e o material foi ressuscitado em solução de NaCl 0,9 % e PMSF na concentração final de 1 mM, em um volume correspondente a cinco vezes o valor da massa da amostra. Em seguida os tubos foram agitados vigorosamente, sendo então deixados em repouso em banho de gelo por 1 hora. Por fim, foi feita uma etapa de centrifugação a 11000 rpm, por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a -20°C.

3.1.7.3.1 Análise da produção de anticorpos anti-rSpaA por ELISA

As amostras de soro e extrato fecal dos animais imunizados foram analisadas por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para titulação da produção de anticorpos específicos contra o antígeno rSpaA de *E. rhusiopathiae* veiculado pela linhagem atenuada de *S. typhimurium*. Os experimentos foram realizados em duplicata e foi feita a titulação dos anticorpos IgA e IgG, além das subclasses IgG1 e IgG2a para avaliar a tendência Th1/Th2 da resposta induzida.

Os tampões utilizados nas análises de ELISA estão descritos a seguir:

Tampão carbonato (pH 9,6):

NaHCO₃ – 2,93 g/L

Na₂CO₃ – 1,59 g/L

Timerosal 0,1 g/L

Tampão PBST (pH 7,4):

NaCl – 8,0 g/L

KCl – 0,2 g/L

Na₂HPO₄.12H₂O – 3,58 g/L

KH₂PO₄ – 0,24 g/L

Tween 20 – 0.05 %

Tampão de revelação (pH 5,0):

Ácido cítrico 0,1 M – 4,9 mL

Na₂HPO₄ 0,2 M – 5,1 mL

Água destilada – 10 mL

Solução de revelação:

5 mg de OPD (o-dihidrocloreto de fenilenediamina)

10 mL tampão de revelação

5 µL H₂O₂ 30 % (v/v)

As placas de 96 poços (Costar – Corning) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de rSpaA purificada e diluída em tampão carbonato

(0,1 µg rSpaA/poço), e incubadas por uma noite a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e foi feito o bloqueio com 200 µL/poço de solução de BSA (soro albumina bovina) 1,0 % (m/v) em PBST por 2 horas a 37°C. Após nova lavagem, volumes de 100 µL/poço das amostras foram aplicadas em diluições seriadas, partindo da diluição de 1:50 para as amostras de soro e de 1:2 para os extratos fecais. As placas foram incubadas novamente a 37°C por um período de 1 a 2 horas, e passaram por nova etapa de lavagem. Foi então feita a incubação com 100 µL/poço do anticorpo secundário anti-mouse IgG de cabra conjugado à peroxidase diluído 1:10000 ou *anti-mouse* IgA de cabra conjugado à peroxidase diluído 1:10000 para as análises de IgG e IgA, respectivamente, ou dos anticorpos *anti-mouse* IgG1 ou IgG2a, ambos de cabra e diluídos 1:2000, para as análises das subclasses. As placas foram incubadas por mais 1 hora a 37°C e lavadas em seguida.

As placas dos ELISAs de IgG1 e IgG2a foram incubadas, ainda, com um anticorpo anti-cabra IgG conjugado à peroxidase (100 µL/poço) diluído 1:10000 por 1 hora a 37°C, sendo posteriormente lavadas. Por fim, foi feita a revelação com 50 µL/poço da solução de revelação por 30 minutos no escuro e a temperatura ambiente. A reação foi finalizada com a adição de 50 µL/poço de solução de H₂SO₄ 1,0 M, e foi feita a leitura de absorbância das amostras em comprimento de onda de 490 nm.

Utilizaram-se como branco da reação os poços que receberam todas as soluções descritas com exceção das amostras. O título foi considerado como o inverso da diluição na qual se obteve absorbância de 0,1.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

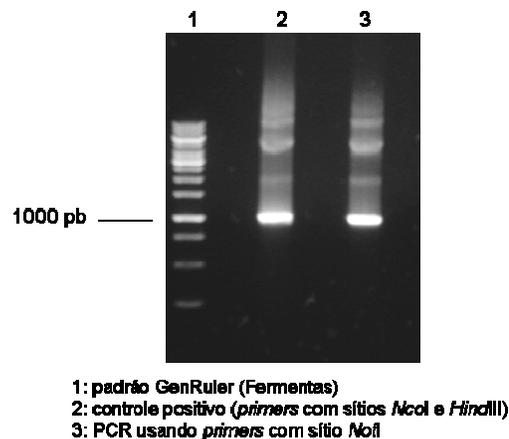
3.2.1 Clonagem do inserto *spaA* amplificado com sítios *NotI* no vetor pGEM-T

Para preparar o inserto *spaA* para a clonagem no vetor de expressão pMOhly1, primeiramente foi necessária a clonagem deste fragmento no vetor de propagação pGEM-T a partir do produto de PCR deste fragmento amplificado com oligonucleotídeos iniciadores contendo o sítio de restrição da enzima *NotI*, que seria usada para linearizar o vetor pMOhly1_adapt na etapa seguinte.

O molde utilizado para a amplificação da seqüência do fragmento *spaA* (agora com sítios nas extremidades para *NotI*) foi a construção pGEM_*spaA* preparada no início deste trabalho (conforme descrito na Seção 3.1), para a posterior clonagem do fragmento no vetor de expressão pET28a, naquela ocasião. O plasmídeo recombinante pGEM_*spaA* contém a seqüência de 1026 pb de um fragmento do gene *spaA* amplificado a partir do DNA genômico de *E. rhusiopathiae*.

A reação de amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores contendo a seqüência do sítio de restrição da enzima *NotI* foi realizada com sucesso utilizando as condições descritas no item 3.1.2.2, e o fragmento amplificado pode ser visto na foto do gel de agarose da Figura 3.4.

Figura 3.4 – Amplificação por PCR do fragmento *spaA* com sítios de restrição *NotI* utilizando como molde o plasmídeo recombinante pGEM_*spaA*



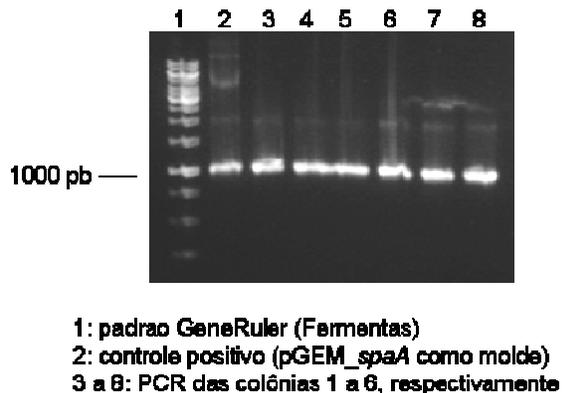
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Obteve-se a amplificação de um fragmento com o tamanho esperado de aproximadamente 1000 pares de base (1026 pb) e o mesmo foi purificado (*kit* Invisorb Fragment CleanUp – Invitex) e usado na reação de ligação no vetor de propagação pGEM-T (Promega).

A reação foi realizada conforme descrito no item 3.1.2.2, e foram obtidas diversas colônias brancas e azuis na placa da transformação.

Seis colônias brancas (recombinantes) foram selecionadas para o *screening* por PCR de colônia, e todas as colônias analisadas tiveram a ligação do inserto no plasmídeo confirmada, como mostra a Figura 3.5.

Figura 3.5 – PCR de colônia da transformação do pGEM-T com o inserto *spaA*_(*NotI*)



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Uma das colônias recombinantes foi inoculada em meio líquido com ampicilina e foi realizada extração do plasmídeo recombinante da mesma. Com a finalidade de diferenciar a construção pGEM_ *spaA* usada como molde e a recém preparada a partir do inserto amplificado com sítios de restrição *NotI*, esta última foi chamada de pGEM_ *spaA*_(*NotI*).

O plasmídeo extraído teve a presença do inserto confirmada por ensaio de restrição com a enzima *NotI* e também por seqüenciamento.

Após a confirmação, foi realizada a digestão da construção pGEM_ *spaA*_(*NotI*) com a enzima *NotI*, e após purificação, o inserto foi utilizado para os procedimentos de clonagem no vetor pMOhly1.

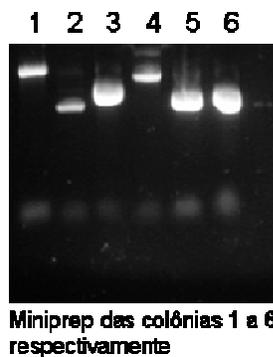
3.2.2 Clonagem do fragmento do gene *spaA*_(*NotI*) no vetor de expressão pMOhly1

O vetor de expressão pMOhly1 doado pelo professor Ivaylo Gentshev (Würzburg Universität – Alemanha) foi utilizado para clonagem do fragmento *spaA*. Neste vetor, a proteína rSpaA deve ser secretada fusionada ao sinal de secreção da hemolisina de *E. coli*, presente no plasmídeo. O sistema é funcional tanto em *E. coli* quanto em *Salmonella*, e por isso foi feita uma caracterização prévia da expressão e secreção da proteína em células de *E. coli* XL1-blue, antes da transformação das linhagens de *S. typhimurium*.

Para o processo de clonagem do inserto *spaA* no vetor pMOhly1, foi necessário introduzir um novo sítio de clonagem no plasmídeo, uma vez que o único

sítio disponível (para enzima *Nsi*I) está presente no gene clonado. Para isso, foi utilizada uma estratégia de adição de moléculas adaptadoras ao vetor, que acrescentaram um sítio para a enzima de restrição *Not*I ao lado do sítio da enzima *Nsi*I, já presente no pMOhly1. A introdução destes adaptadores foi confirmada em uma das seis colônias analisadas nesta etapa. Para isto, as colônias que adquiriram resistência à ampicilina após a transformação das células de *E. coli* DH5 α com o produto da ligação do plasmídeo mais adaptadores e inserto foram inoculadas em meio LB com ampicilina e tiveram seus plasmídeos extraídos (*kit* Invisorb Spin Plasmid Mini Two – Invitex), como mostra a Figura 3.6.

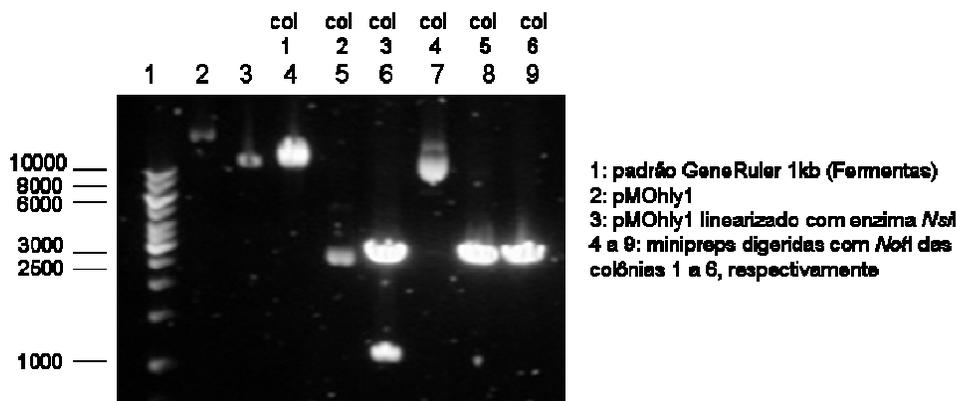
Figura 3.6 – Plasmídeos extraídos das colônias de *E. coli* resistentes a ampicilina após transformação com o produto da reação de ligação entre pMOhly1 + adaptadores + inserto



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

O passo seguinte foi a digestão destas extrações plasmidiais com a enzima de restrição *Not*I. Nesta etapa, somente os vetores onde houve a ligação dos adaptadores deveriam ser linearizados, e no caso de ter ocorrido também a ligação do inserto em algum dos plasmídeos extraídos, seria observada a presença do inserto no gel de agarose. A Figura 3.7 traz o resultado deste tratamento com a enzima *Not*I.

Figura 3.7 – Digestão das mini-preparações da transformação pMOhly1 + adaptadores + inserto com a enzima *NotI*.

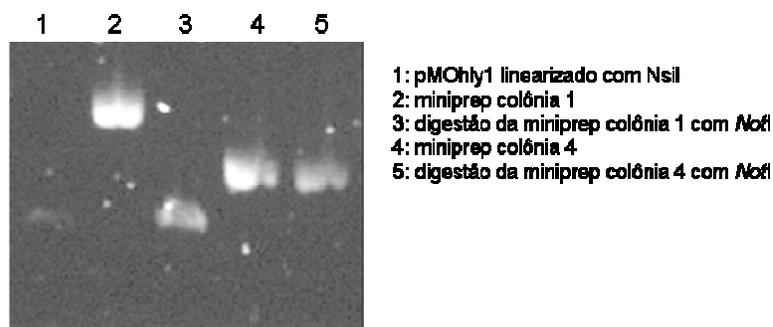


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Como mostrado na Figura 3.7, apenas os plasmídeos linearizados das colônias 1 e 4 apresentaram tamanhos compatíveis com o esperado (semelhantes ao vetor pMOhly1 linearizado – linha 3). Não foi observada a presença da banda do inserto na digestão destes plasmídeos com a enzima *NotI*, e assim concluiu-se que deveria ter ocorrido a inserção das moléculas adaptadoras, porém não houve a ligação do inserto *spaA* no DNA plasmidial destas colônias.

A análise por restrição enzimática do plasmídeo extraído da colônia 4 indicou que este não apresentava sítio de restrição para a enzima *NotI*, diferentemente do DNA plasmidial extraído da colônia 1 (Figura 3.8).

Figura 3.8 – Digestão das mini-preparações das colônias 1 e 4 com enzima de restrição *NotI*

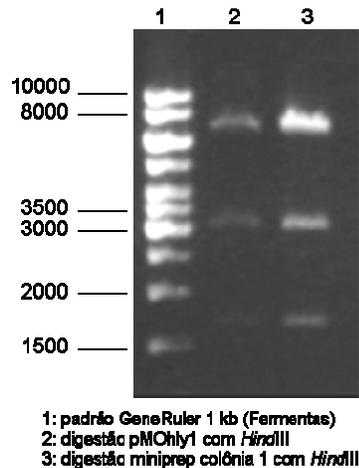


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Para confirmar que o plasmídeo introduzido na colônia 1 se tratava do pMOhly1 ligado aos adaptadores (e não algum tipo de artefato, como nas demais

colônias) foi comparado o perfil das bandas deste plasmídeo e do pMOhly1 digeridos com a enzima de restrição *Hind*III. O resultado é mostrado na Figura 3.9.

Figura 3.9 – Digestão do plasmídeo extraído da colônia 1 e do plasmídeo pMOhly1 com a enzima de restrição *Hind*III

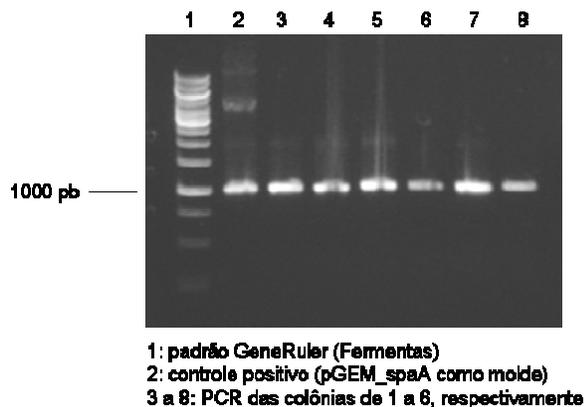


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Como pode ser visto na Figura 3.9 foi obtido o mesmo perfil de bandas na digestão das duas amostras, indicando que o DNA extraído a partir da colônia 1 era realmente derivado do pMOhly1. A confirmação final da obtenção do vetor pMOhly1 ligado aos adaptadores (pMOhly1_adapt) a partir da extração plasmidial desta colônia foi feita por seqüenciamento, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores listados no Quadro 3.2.

Após a obtenção do vetor já contendo o sítio de restrição da enzima *Not*I adicionado através das moléculas adaptadoras, foi realizada a reação de ligação do mesmo com o inserto extraído da construção pGEM-*spaA*_(*Not*I), também digerido com a enzima de restrição *Not*I. Foram obtidas diversas colônias após a transformação das células competentes de *E. coli* DH5 α com a reação de ligação, e as seis colônias inicialmente analisadas por PCR apresentaram o inserto *spaA* ligado ao vetor, como pode ser visto na Figura 3.10.

Figura 3.10 – PCR de colônia da transformação do pMOhly1 com o inserto *spaA*_(*NotI*)

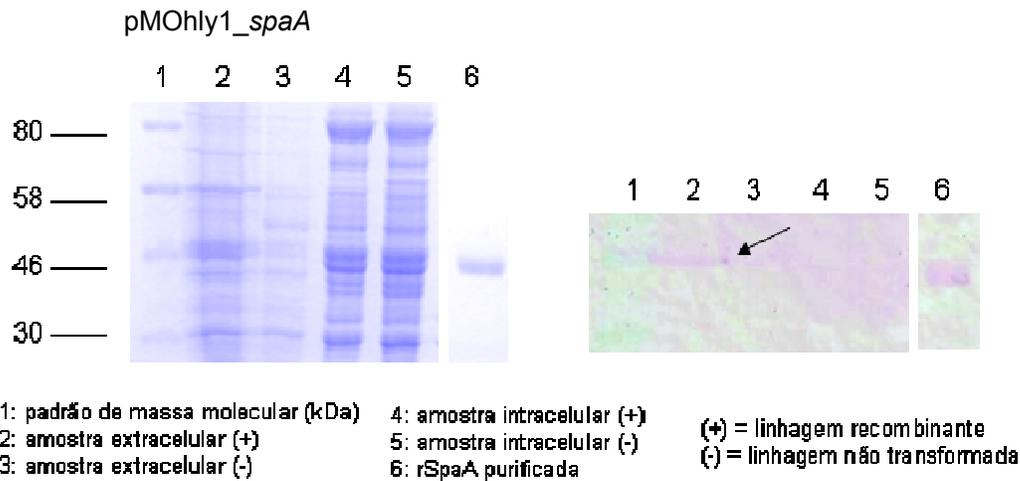


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Os plasmídeos extraídos das seis colônias foram seqüenciados para checar a orientação do inserto ligado ao vetor, já que ambas as extremidades do fragmento foram digeridas com a mesma enzima de restrição (*NotI*). Após o resultado do seqüenciamento, o plasmídeo extraído a partir de uma colônia que apresentou o inserto clonado na orientação correta (sentido 5'→3' do fragmento *spaA*), foi utilizado para transformação da linhagem de expressão de *E. coli* XL-1 Blue.

3.2.3 Expressão da rSpaA fusionada ao sinal de secreção da α -hemolisina pelas células de *E. coli* XL1-blue

A proteína de interesse foi detectada por anticorpos anti-rSpaA na análise de *Western blot* da amostra do sobrenadante concentrado a partir do cultivo do clone *E. coli* XL1-blue pMOhly1_ *spaA*, não sendo verificada nenhuma reação nas amostras do controle negativo. A Figura 3.11 mostra o resultado deste experimento.

Figura 3.11 – SDS-PAGE e *Western blot* das amostras do cultivo do clone *E. coli* XL1-blue

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

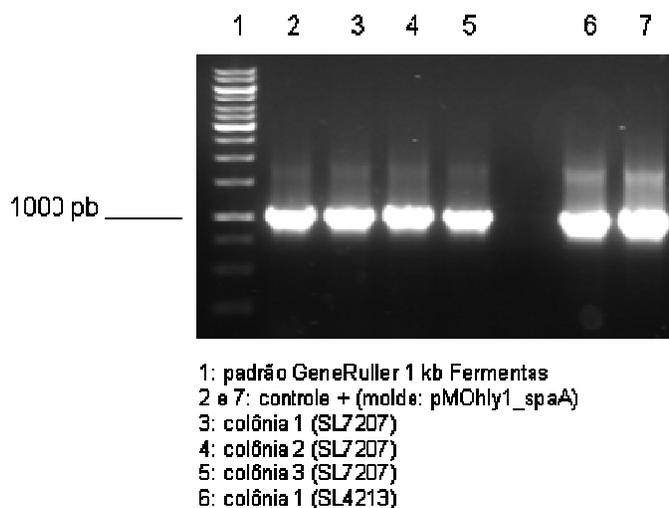
A detecção da proteína rSpaA na amostra do sobrenadante mostrou que sua expressão e secreção pelo sistema da α -hemolisina foi bem sucedida utilizando as células de *E. coli* XL1-blue. Neste experimento também ficou constatado que esse anticorpo é capaz de reconhecer a rSpaA fusionada ao sinal de secreção da hemolisina (linha 2). A fusão da rSpaA com os aminoácidos codificados pelo fragmento do gene da hemolisina presente no plasmídeo pMOhly1 gerou uma proteína com tamanho superior a rSpaA produzida a partir da clonagem no vetor pET.

3.2.4 Transformação das linhagens de *S. typhimurium* SL4213 e SL7207 com a construção pMOhly1_ *spaA*

A linhagem de *S. typhimurium* SL4213 é deficiente em restrição e proficiente em modificação (r-, m+). Por esse motivo o DNA de interesse foi inicialmente inserido em células dessa linhagem para que pudesse ser modificado segundo os padrões de metilação característicos das células de *Salmonella*, o que confere ao fragmento resistência contra clivagens por enzimas de restrição da espécie, e em seguida foi utilizado para transformar células da linhagem vacinal SL7207.

A Figura 3.12 mostra o fragmento do gene *spaA* amplificado por PCR a partir do DNA plasmidial extraído de ambas as linhagens, após a transformação das mesmas por eletroporação.

Figura 3.12 – Amplificação por PCR do fragmento *spaA* a partir do DNA plasmidial das colônias de *S. typhimurium* SL4213 e SL7207 transformadas com a construção pMOhly1_*spaA*



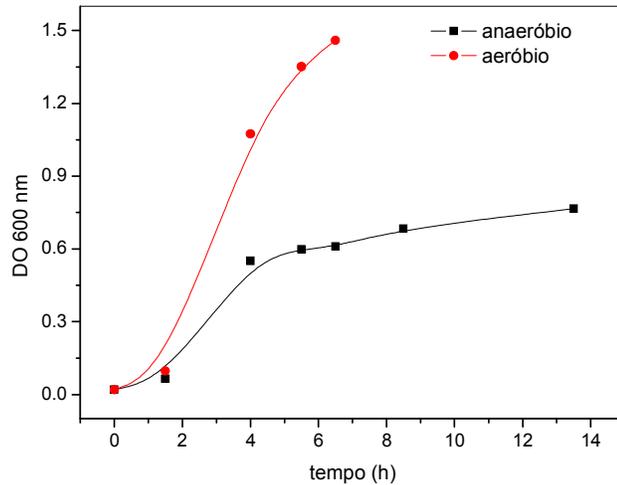
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

As colônias transformadas foram repicadas em placas de 2YT ágar e armazenadas em glicerol 10 % (v/v) a -80°C . O DNA plasmidial extraído foi seqüenciado, confirmando a presença do inserto *spaA* na orientação desejada.

3.2.5 Caracterização *in vitro* da linhagem vacinal *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_*spaA*

A linhagem recombinante em estudo foi cultivada em diferentes condições de aeração - com agitação de 200 rpm (aerobiose) ou sem agitação (anaerobiose) - para a coleta de amostras do sobrenadante do cultivo e comparação da produção e secreção do antígeno recombinante rSpaA sob diferentes regimes de aeração. Os resultados desses experimentos também foram utilizados para uma caracterização inicial da cinética de crescimento e produção de metabólitos do microrganismo. A Figura 3.13 mostra o perfil de crescimento observado para as duas condições.

Figura 3.13 – Comparação do crescimento do clone SL7207 pMOhly1_spaA sob diferentes condições de aeração



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Como esperado, o crescimento celular foi favorecido na condição com maior disponibilidade de oxigênio dissolvido, e em apenas 6,5 horas de cultivo atingiu-se $DO_{600nm} = 1.5$ na condição aeróbia. Na condição de cultivo estática, as células levaram o dobro do tempo para atingirem apenas metade da concentração observada na condição agitada.

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) calculada foi de $1,0 \text{ h}^{-1}$ para a condição aeróbia e $0,83 \text{ h}^{-1}$ para a anaeróbia. Apesar do valor relativamente alto observado para a condição estática, o crescimento celular foi desacelerado após 4 horas de cultivo provavelmente pelo acúmulo de metabólitos tóxicos. A determinação da concentração destas substâncias foi realizada apenas para a amostra do final de cada experimento. Neste momento foram detectados os ácidos acético e succínico para ambas as condições, como apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Concentração de metabólitos ao final dos cultivos de *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_ *spaA* sob diferentes condições de aeração

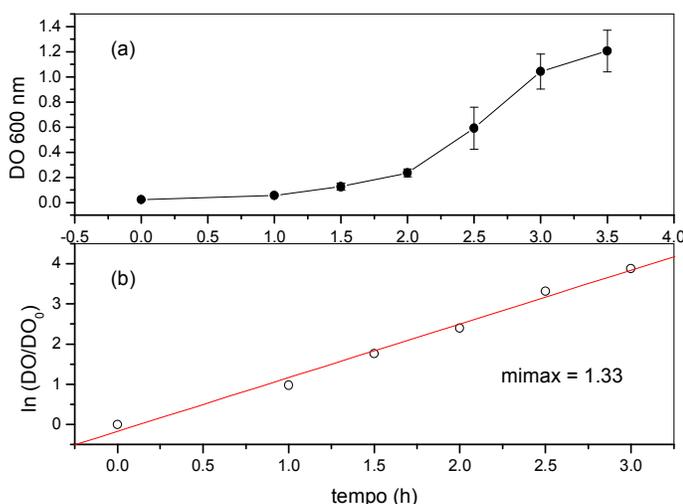
Condição de aeração	Ácido acético (g/L)	Ácido succínico (g/L)
Aeróbio	9,45	0,51
Anaeróbio	7,60	0,98

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

A produção de ácidos orgânicos em ambas as condições indica que houve saturação da via respiratória e/ou oxigenação insuficiente, de forma que as vias fermentativas foram ativadas. A concentração mais alta de acetato encontrada ao final do cultivo aeróbio deve estar relacionada à maior quantidade de células nessa condição. Etanol e ácido lático não foram detectados.

Os ensaios realizados para preparação da curva de calibração entre DO e UFC/mL foram agrupados e utilizados para a confecção de uma curva média de crescimento celular, em cultivos com agitação de 200 rpm. A Figura 3.14 apresenta estes resultados, juntamente com a curva para estimativa da velocidade específica máxima de crescimento a partir dos dados de DO.

Figura 3.14 – Curvas de crescimento celular de *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_ *spaA*. (a) medidas de DO_{600 nm}. (b) estimativa de μ_{max} .

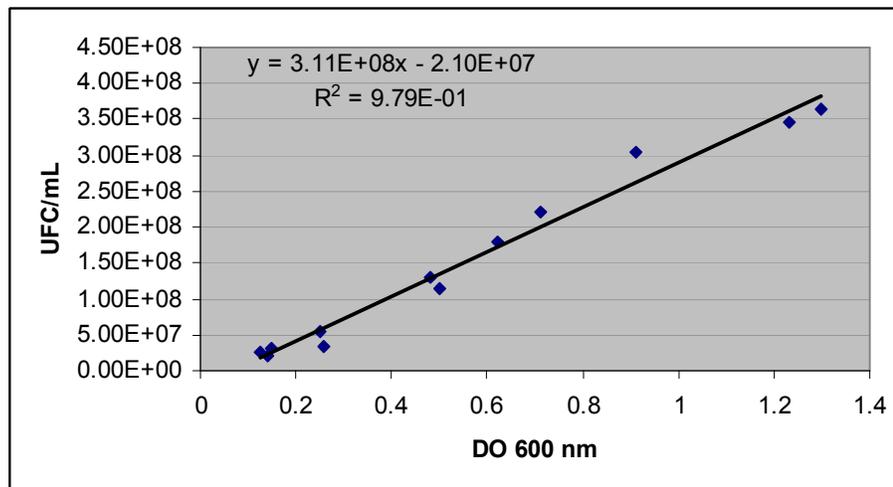


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Nas condições estudadas, as células apresentaram uma fase *lag* de curta duração e cresceram exponencialmente até atingirem DO_{600nm} de aproximadamente 1,0. A partir desse ponto observou-se um perfil de desaceleração do crescimento, relacionado ao esgotamento de algum substrato e/ou acúmulo de metabólitos tóxicos. A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) estimada foi de $1,33\text{ h}^{-1}$.

A Figura a seguir apresenta a curva de calibração entre DO e UFC/mL para a linhagem vacinal recombinante.

Figura 3.15 – Curva de calibração entre contagem de UFC/mL e medidas de DO_{600nm}



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

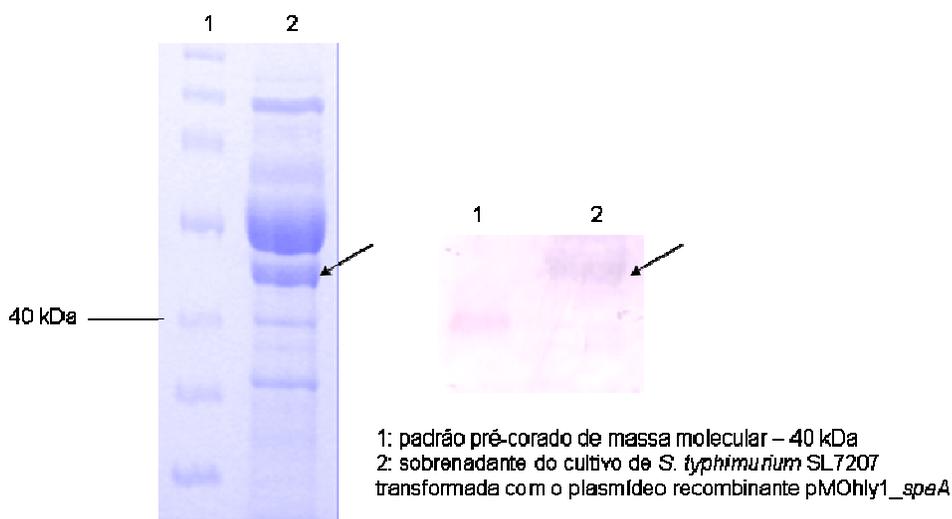
A curva obtida foi utilizada para calcular os fatores de concentração dos cultivos feitos para preparação das doses usadas nos experimentos de imunização dos animais.

Pela análise em dois dos cultivos realizados, não foi detectada instabilidade segregacional do plasmídeo pMOhly1_ *spaA* carregado pela linhagem *S. typhimurium* SL7207 e, em ambos os ensaios avaliados, a retenção do plasmídeo recombinante foi de 100 % ao final do experimento ($t = 4\text{h}$).

A avaliação da capacidade do vetor vivo recombinante construído de expressar e secretar o antígeno rSpaA de *E. rhusiopathiae* foi avaliada *in vitro* por análises de *Western blot* de amostras do sobrenadante do cultivo da linhagem vacinal.

A revelação da banda de aproximadamente 42 kDa da amostra do sobrenadante na membrana incubada com anticorpos anti-rSpaA específicos confirmou o sucesso do clone *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_ *spaA* em expressar e fazer o transporte do antígeno rSpaA para o meio extracelular por meio do sistema de secreção da alfa-hemolisina. A Figura 3.16 apresenta esse resultado.

Figura 3.16 – Análise das proteínas do sobrenadante do cultivo do clone *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_ *spaA* por SDS-PAGE e *Western blot* com anticorpos anti-rSpaA.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Foram feitos experimentos adicionais para avaliar se a expressão do antígeno seria favorecida nas condições descritas por MOURIÑO e colaboradores (1994) como favoráveis à expressão da hemolisina de *E. coli*. Estes autores relataram a obtenção de maiores concentrações da alfa-hemolisina em condições de baixa osmolaridade, temperaturas mais elevadas (37°C ao invés de 20°C) e baixa oxigenação. Neste trabalho foram realizados ensaios com meio 2YT sem NaCl e meio LB sem NaCl para simular a condição de baixa osmolaridade, e também alguns cultivos sem agitação para reduzir a oxigenação no meio de cultivo, mas em nenhum dos casos foi detectada maior expressão do antígeno em estudo. O efeito da temperatura não foi avaliado.

3.2.6 Caracterização *in vivo* da linhagem vacinal *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_ *spaA*

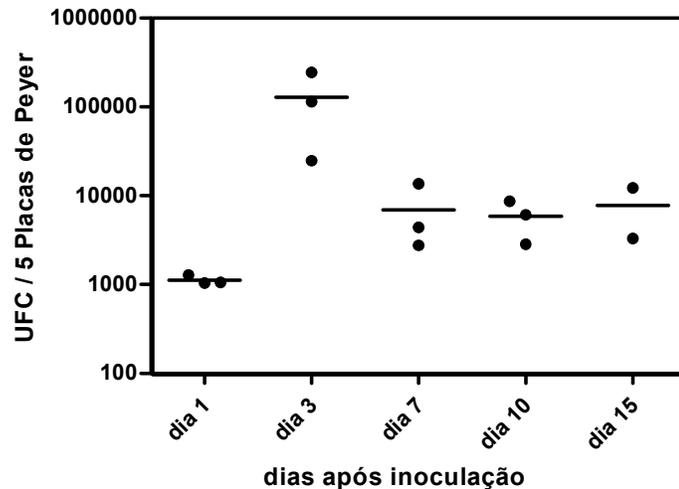
3.2.6.1 Capacidade de colonização e invasão

A capacidade de colonização e invasão da linhagem recombinante construída foi confirmada pela recuperação das bactérias a partir das placas de Peyer e dos baços coletados dos animais inoculados.

As placas de Peyer são formadas por um agregado de folículos linfóides, e fazem parte do tecido linfóide associado ao intestino. Essas estruturas são recobertas por uma camada de epitélio onde se encontram as células multifenestradas (células M) (MURPHY *et al.*, 2010). Estas são células epiteliais especializadas em coletar antígenos, e são usadas por patógenos entéricos, como a *Salmonella*, como porta de entrada através do epitélio intestinal. Dessa forma, essas células formam uma rota de acesso direto para os macrófagos e células dendríticas, que se posicionam abaixo da camada de epitélio onde estão as células M, possibilitando o estabelecimento de uma infecção intracelular e conseqüente disseminação sistêmica da bactéria (LAHIRI *et al.*, 2010).

A presença e permanência das bactérias por mais de 15 dias nas placas de Peyer (PP) atestaram a capacidade de colonização da linhagem vacinal construída. Observou-se um aumento do número de bactérias recuperadas nos primeiros dias, mas devido à atenuação da linhagem empregada, verificou-se em seguida um decréscimo acentuado neste número, refletindo a incapacidade dessa linhagem de realizar seu processo de replicação pela falta de componentes essenciais à sua multiplicação (nesse caso, de compostos aromáticos). A Figura 3.17 mostra o perfil de colonização e posterior clareamento da linhagem vacinal recombinante traçado a partir da contagem de UFC/mL recuperadas das Placas de Peyer dos animais inoculados.

Figura 3.17 – Contagem de colônias recuperadas das placas de Peyer dos animais inoculados com o vetor vivo recombinante *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_spaA ao longo do tempo



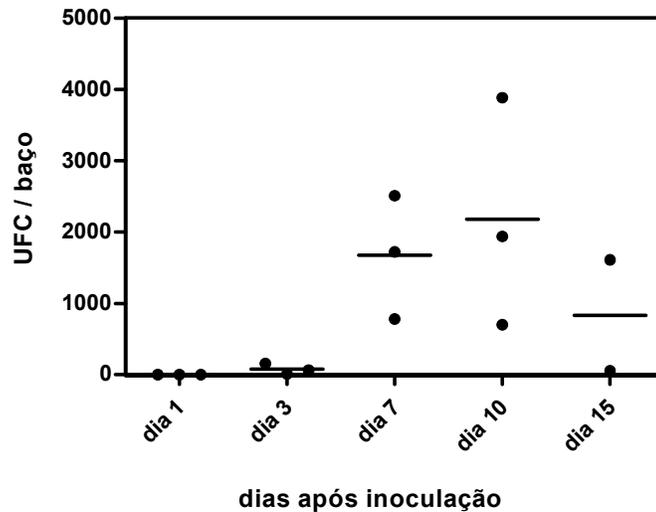
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Os dados apresentados em cada ponto do gráfico mostrado na Figura 3.17 representam a média do número de bactérias recuperadas das placas de Peyer de 3 camundongos. Observou-se uma variabilidade significativa entre os animais, como esperado, mas todos apresentaram o mesmo perfil de colonização, com um pico nas amostras coletadas após 3 dias da inoculação. O último ponto apresenta os resultados apenas de 2 animais porque o 3º animal desse conjunto foi a óbito no momento da inoculação. Os resultados mostram que após o primeiro dia de inoculação foram recuperadas cerca de 1×10^3 UFC das 5 PP, e após 3 dias de colonização esse número chegou a média de 1×10^5 UFC/5PP, regredindo nos dias seguintes para valores em torno de 6×10^3 UFC/5PP.

A capacidade de invasão do vetor vacinal foi confirmada pela recuperação de bactérias a partir dos baços coletados dos animais inoculados. A presença de células da *S. typhimurium* vacinal nesse tecido mostra que as mesmas foram fagocitadas por macrófagos após terem invadido o epitélio intestinal via células M.

Os números médios de UFC/mL recuperados dos baços dos animais são mostrados na Figura 3.18.

Figura 3.18 – Contagem de colônias recuperadas do baço dos animais inoculados com o vetor vivo recombinante *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_spaA ao longo do tempo

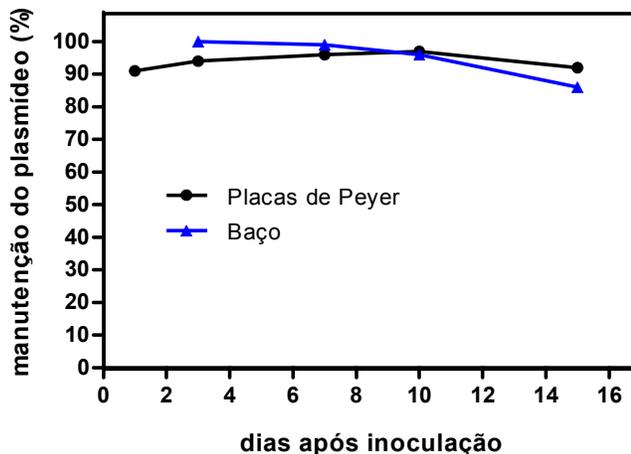


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

De forma semelhante à colonização das placas de Peyer, o número de UFC/mL recuperadas nos baços apresentou perfil de aumento seguido de decréscimo acentuado, como esperado. A variabilidade entre os animais foi mais uma vez observada, mas o perfil de invasão e clareamento foi o mesmo para todos, com um pico médio de um pouco mais de 2×10^3 UFC/baço no 10º dia após inoculação.

Os resultados da manutenção do plasmídeo recombinante pelo vetor vacinal recuperado do baço e placas de Peyer dos animais inoculados estão apresentados na Figura 3.19.

Figura 3.19 – Acompanhamento da manutenção do plasmídeo recombinante das células de *S. typhimurium* SL7207 pMOhly1_ *spaA* recuperadas do baço e Placas de Peyer dos animais imunizados



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

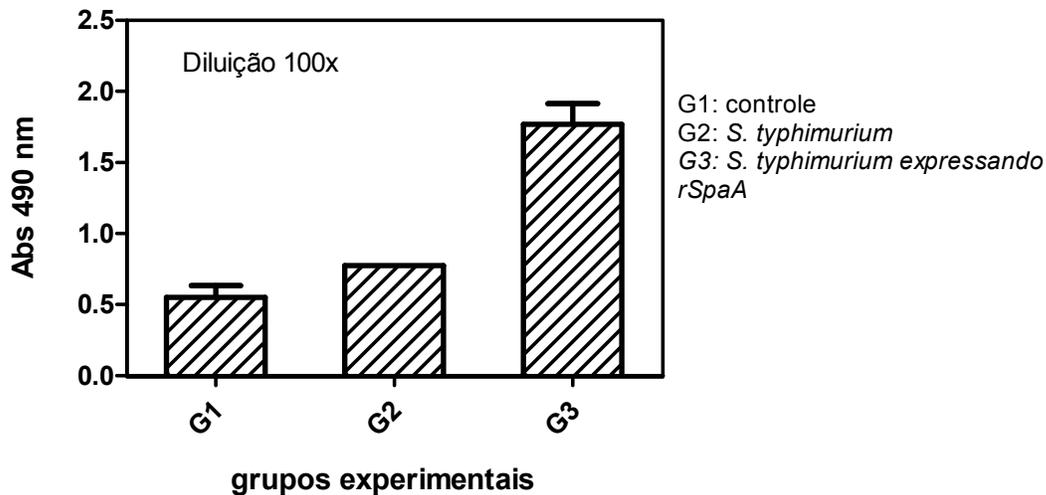
Houve alta taxa de manutenção do plasmídeo recombinante nas células recuperadas de ambos os tecidos. Mesmo nas amostras coletadas após 15 dias da inoculação, os valores da retenção foram próximos a 90 %, atestando uma ótima estabilidade do vetor vacinal recombinante, mesmo na ausência da pressão seletiva (ampicilina) *in vivo*.

3.2.6.2 Ensaio de imunização

O soro dos animais inoculados com bicarbonato de sódio (G1), com *S. typhimurium* SL7207 sem o plasmídeo recombinante (G2), e com a linhagem vacinal *S. typhimurium* SL7207 transformado com o plasmídeo recombinante pMOhly1_ *spaA* (G3), foram analisados quanto à presença de anticorpos específicos anti-rSpaA. As amostras de soro foram coletadas ao final do esquema de imunização em 3 doses.

A Figura 3.20 apresenta a produção de anticorpos IgG específicos contra a proteína rSpaA dos soros dos animais após esquema de imunização oral em 3 doses.

Figura 3.20 – IgG sérico contra rSpaA medido por ELISA após imunização em 3 doses



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

A presença de anticorpos IgG anti-rSpaA no soro dos animais do G3, atestada pelo título consideravelmente maior desses anticorpos nessas amostras frente às dos outros dois grupos, indica que o vetor vacinal construído teve êxito em expressar e apresentar o antígeno de interesse *in vivo*, gerando uma resposta humoral específica contra a proteína heteróloga rSpaA.

Estudos anteriores utilizando o antígeno SpaA (MAKINO *et al.*, 1998; IMADA *et al.*, 1999; SHIMOJI *et al.*, 1999; KITAJIMA *et al.*, 2000; YOKOMIZO *et al.*, 2002; CHEUN *et al.*, 2004) mostraram que a produção de anticorpos específicos anti-SpaA, tanto em modelo murino quanto em suínos, confere proteção aos animais em ensaios de desafio com o agente etiológico da erisipela suína. Os anticorpos anti-SpaA devem mediar a opsonização da bactéria via fagocitose do tipo 1, ativando importantes mecanismos bactericidas intracelulares (SHIMOJI, 2000).

O resultado apresentado na Figura 3.20 indica que a imunização com a formulação vacinal proposta neste trabalho deve conferir uma proteção parcial ou total contra o agente infeccioso *E. rhusiopathiae* em modelo murino, já que esta formulação estimulou a produção de anticorpos protetores anti-rSpaA nos animais.

Foi feita também a análise da produção de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a. Essa análise permite inferir o padrão de resposta (Th1/Th2) dos linfócitos T CD4+ efetores. Essa correlação é possível porque as citocinas que induzem uma

resposta celular (Th1) predominante também induzem a troca de classe das imunoglobulinas para a isoforma IgG2a e inibem a troca para IgG1. De forma oposta, as citocinas que estimulam uma resposta humoral (Th2) levam à troca de classe para IgG1 e inibem a troca para IgG2a (MURPHY *et al*, 2010).

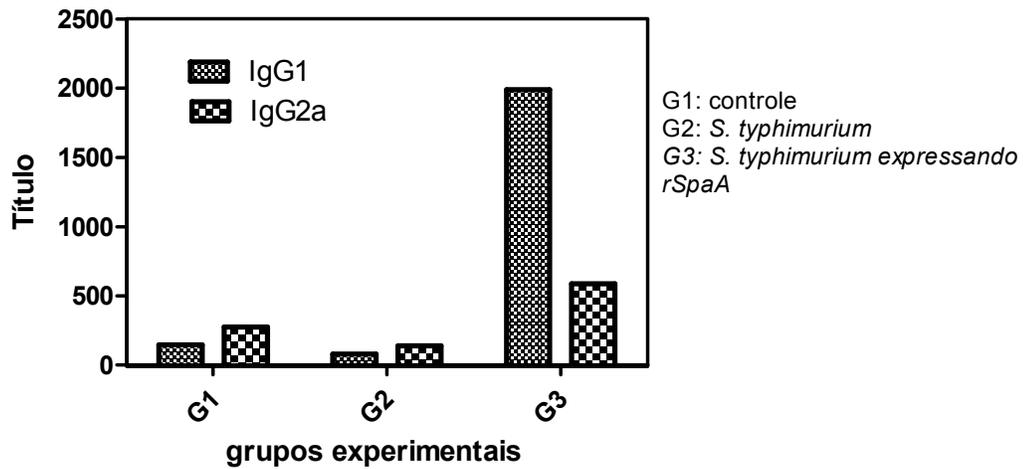
Uma resposta do tipo 1 é indicativa da imunidade mediada por células, enquanto uma resposta do tipo 2 está relacionada a alta produção de anticorpos. Para o caso da erisipela suína, ambas as respostas apresentam atributos desejáveis em termos de geração de uma imunidade protetora (SHIMOJI, 2000). A resposta celular (Th1) é importante para o combate da bactéria na sua forma de infecção intracelular, enquanto a resposta humoral (Th2) é importante para neutralizar o patógeno nos sítios de entrada.

O estudo de KAREM e colaboradores (1996) reportou a análise da produção de citocinas no tecido linfóide associado ao intestino (GALT) após inoculação oral de linhagens atenuadas de *Salmonella typhimurium*. Os resultados deste trabalho mostraram que a *Salmonella* pode induzir ambos os tipos de resposta (Th1 e Th2). Segundo os autores, o desenvolvimento de uma resposta Th1 ou Th2 majoritária deve depender também de outros fatores além do microrganismo usado como veículo. Entre esses fatores, a carga antigênica, o microambiente, e a natureza do antígeno devem contribuir para o tipo de resposta imune induzida, influenciando assim a distribuição das subclasses de IgG.

A análise das subclasses de IgG anti-rSpaA do soro dos animais revelou a presença de uma resposta mista Th1 e Th2, pois foi detectada a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para o antígeno em estudo nas amostras do grupo imunizado com a formulação vacinal (G3).

A Figura 3.21 traz os títulos de anticorpos das subclasses de IgG detectados nos soros dos animais dos três grupos experimentais após esquema de vacinação.

Figura 3.21 – IgG1 e IgG2a séricas contra rSpaA após imunização em 3 doses



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Nas amostras de soro coletadas após o esquema de imunização observou-se uma tendência de resposta do tipo Th2, pois a produção de anticorpos da subclasse IgG1 foi mais acentuada que da subclasse IgG2a.

Na literatura grande parte dos trabalhos empregando vacinas orais de *Salmonella* com expressão de antígenos heterólogos relata respostas predominantemente do tipo Th1 (KAREM *et al.*, 1996), mas há exceções, como por exemplo, a subunidade B da toxina da cólera, que induz resposta do tipo Th2 (HAROKOPAKIS *et al.*, 1997), ou ainda mudanças no padrão de resposta durante a imunização (PASCUAL *et al.*, 1999).

Não foram detectados níveis significativos de anticorpos do tipo IgA nos extratos fecais.

4 CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO

Os resultados obtidos neste trabalho apresentam potencial de aplicação para o desenvolvimento de uma nova vacina contra a erisipela suína.

Nos estudos realizados sobre a produção do antígeno rSpaA por células recombinantes de *E. coli*, verificou-se a viabilidade de empregar meio complexo, contendo extrato de levedura e triptona como fontes de nitrogênio, e glicerol como fonte de carbono. Nos cultivos realizados foram alcançadas concentrações celulares de até 66 g/L em apenas 16 h de cultivo, sem acúmulo de metabólitos inibidores do crescimento. Em termos de expressão da proteína heteróloga, foram obtidos diferentes rendimentos de acordo com a estratégia de cultivo e indução empregada. A condição de auto-indução se mostrou mais apropriada para cultivos em batelada simples, levando aos mais altos valores de rendimento da proteína recombinante (198 mg_{prot}/g_{DCW}). O protocolo de indução contínua com lactose na fase de alimentação permitiu alcançar um bom balanço entre o rendimento e a produtividade volumétrica, com valores de 148 mg_{prot}/g_{DCW} e 0,323 g_{prot}/L.h, respectivamente. Já a indução com pulso de lactose precedida por crescimento celular em um meio contendo uma mistura de glicerol e glicose, juntamente com o controle da vazão de alimentação por meio da inferência *on-line* da velocidade de crescimento, levou a obtenção de uma maior produtividade volumétrica do antígeno recombinante (0,40 g_{prot}/L.h).

Estes protocolos estudados de cultivo e indução possibilitaram a produção da proteína rSpaA em concentrações da ordem de 6 g/L ao final dos processos (correspondendo aproximadamente a 25 % do conteúdo protéico celular), em cultivos de curta duração e sem acúmulo de metabólitos tóxicos, usando glicerol como principal fonte de carbono e lactose como indutor. De forma geral, as estratégias estudadas neste trabalho podem também ser empregadas para produção de outras proteínas recombinantes em HCDC de *E. coli*.

Na segunda parte do trabalho, a clonagem do antígeno SpaA em *S. typhimurium* e a caracterização do vetor vivo recombinante foi realizada com êxito.

A inserção de um novo sítio de restrição no vetor pMOhly1 possibilitou a clonagem do fragmento do gene *spaA* fusionado ao sinal de secreção da alfa-hemolisina codificado no plasmídeo. A expressão e secreção do antígeno

recombinante para o meio extracelular por esse sistema foi confirmada por análises de *Western blot* de amostras do sobrenadante dos cultivos tanto de células de *E. coli* XL1-blue quanto de *S. typhimurium* SL7207 transformadas com a construção pMOhly1_ *spaA*.

O plasmídeo recombinante se mostrou altamente estável em células transformadas de *S. typhimurium* SL7207 tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo mantido em torno de 90 % das células recuperadas dos tecidos dos animais inoculados, mesmo após um período de 15 dias. Esse resultado mostrou que a expressão do antígeno SpaA e das demais proteínas do cassete da alfa-hemolisina codificadas no plasmídeo não causou uma sobrecarga metabólica significativa no microrganismo utilizado como vetor vivo, o que configura uma característica fundamental para o seu emprego em uma estratégia vacinal.

A linhagem recombinante de *S. typhimurium* expressando o antígeno SpaA mostrou capacidade de colonização e invasão, persistindo nas placas de Peyer por um período superior a 15 dias e sendo encontrada no baço dos animais inoculados após o 3º dia da inoculação. Estas características apresentadas pela linhagem vacinal são importantes para que haja uma apresentação adequada do antígeno de interesse ao sistema imune.

Os ensaios de imunização em modelo murino indicaram que a linhagem vacinal recombinante foi capaz de expressar e apresentar o antígeno heterólogo *in vivo*, e que os animais vacinados produziram uma resposta humoral com a produção de anticorpos séricos IgG anti-rSpaA. O estudo das subclasses de IgG presentes no soro dos animais inoculados indicou um padrão de resposta mista com predominância do tipo Th2. De acordo com a literatura, os anticorpos anti-SpaA conferem proteção aos animais frente a desafios com cepas virulentas de *E. rhusiopathiae*, e por isso, é possível prever que a formulação vacinal proposta neste trabalho tem potencial de conferir algum nível de proteção contra a erisipela suína. Experimentos de desafio com a linhagem virulenta NCTC11002 de *E. rhusiopathiae* estão em fase de finalização para avaliar este grau de proteção.

Para a continuação do trabalho aqui iniciado, propõe-se o estudo em biorreatores de bancada do cultivo da linhagem vacinal de *S. typhimurium* para estimativa de parâmetros cinéticos de crescimento do microrganismo recombinante e posterior estabelecimento de protocolos de cultivos de alta densidade do mesmo. Há escassez na literatura sobre informações a esse respeito, e tais estudos

poderiam contribuir para o desenvolvimento de diversas vacinas em estudo que empregam linhagens atenuadas de *S. typhimurium* como vetores bacterianos vivos para veiculação de antígenos heterólogos.

Outro ponto de grande importância para a pesquisa de novas vacinas contra a erisipela suína é a busca de novos alvos antigênicos de *E. rhusiopathiae* a partir dos dados provenientes do recente seqüenciamento do genoma deste microrganismo. Nesse sentido, podem ser empregadas técnicas de imunoproteômica, onde é possível identificar por *Western blot* quais proteínas do microrganismo são reconhecidas pelo soro de animais infectados, após resolução do extrato protéico bacteriano por eletroforese bidimensional, por exemplo.

Ainda, para a formulação de uma vacina baseada no antígeno SpaA purificado ou em outros antígenos, há necessidade de avaliar o emprego conjunto de adjuvantes adequados para uso veterinário e que promovam a indução de uma resposta imune protetora, já que apenas o antígeno purificado não é capaz de induzir tal resposta. Os estudos de CHEUN e colaboradores (2004) já mostraram resultados promissores nesse sentido com a toxina da cólera, inclusive para inoculação por via nasal, mas a avaliação de outros adjuvantes deve ser encorajada.

5 REFERÊNCIAS

BRADFORD, W.; SHIVE, D. V. M. Erysipelas - past and present. *Pfizer Animal Health*, 1998.

BROOKE, C. J.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, v. 48, n. 9, p. 789-799, 1999.

CALDWELL, R. B.; LATTEMANN, C. T. Simple and reliable method to precipitate proteins from bacterial culture supernatant. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 610-612, 2004.

CARDENAS, L.; CLEMENTS, J. D. Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 5, p. 328-342, 1992.

CHEUN, H. I.; KAWAMOTO, K.; HIRAMATSU, M., *et al.* Protective immunity of SpaA-antigen producing lactococcus lactis against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, n. 6, p. 1347-1353, 2004.

CONKLIN, R. H.; STEELE, J. H. *Erysipelothrix* infeccions. In: (Ed.). *Series in zoonoses*. Boca Raton: CRC Press, v.1, 1979. p.327-337

COUTINHO, T. A.; IMADA, Y.; DE BARCELLOS, D. E. S. N., *et al.* Genotyping of Brazilian *Erysipelothrix* spp. Strains by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Microbiological Methods*, v. 84, n. 1, p. 27-32, 2011.

DE MEY, M.; DE MAESENEIRE, S.; SOETAERT, W. *et al.* Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 34, p. 689-700 (2007).

DIETRICH, G.; KOLB-MÄURER, A.; SPRENG, S. *et al.* Gram-positive and Gram-negative bacteria as carrier systems for DNA vaccines. *Vaccine*, v.19, p. 2506-2512, 2001.

EAMENS, G.J.; FORBES, W.A.; DJORDJEVIC, S.P. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from pigs associated with vaccine breakdowns. *Veterinary Microbiology*, v. 115, p.329-338, 2006.

EITEMAN, M. A.; ALTMAN, E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *TRENDS in Biotechnology*, v. 24, n. 11, p. 530-536, 2006.

FREEMAN, M. J. Effects of vaccination on the development of arthritis in swine with erysipelas: Clinical, hematological, and gross pathological observations. *American Journal of Veterinary Research*, v. 27, p. 597-606, 1964.

GALAN, J. E.; TIMONEY, J. F. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Infection and Immunity*, v. 58, n. 9, p. 3116-3121, 1990.

GENTSCHEV, I.; DIETRICH, G.; GOEBEL, W. The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *TRENDS in Microbiology*, v. 10, p. 39-45, 2002b.

GENTSCHEV, I.; DIETRICH, G.; SPRENG, S. *et al.* Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 291, p. 577-582, 2002a.

GENTSCHEV, I.; GLASER, I.; GOEBEL, W. *et al.* Delivery of the p67 sporozoite antigen of *Theileria parva* using recombinant *Salmonella*: secretion of the product enhances specific antibody responses in cattle. *Infection and Immunity*, v. 66, p. 2060-2064, 1998.

GENTSCHEV, I.; MOLLENKOPF, H.; SOKOLOVIC, Z. *et al.* Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway. *Gene*, v. 179, p. 133-140, 1996.

GENTSCHEV, I.; MOLLENKOPF, H.; SOKOLOVIC, Z. *et al.* Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway. *Gene*, v. 179, p. 133-140, 1996.

GOEBEL, W.; HEDGPETH, J. Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 151, p. 1290-1298, 1982.

GOEBEL, W.; SPRINGER, W. Synthesis and secretion of hemolysin by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 144, p. 53-59, 1980.

GOMBERT, A. K.; Kilikian, B. V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *Journal of Biotechnology*, v. 60, p. 47-50, 1998.

GOMEZ-DUARTE, O. G.; PASETTI, M. F.; SANTIAGO, A. *et al.* Expression, extracellular secretion, and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 in *Salmonella* vaccine strains. *Infection and Immunity*, v. 69, p. 1192-1198, 2001.

GONZALES-CARRERO, M. I.; ZABALA, J. C.; DE LA CRUZ, F. *et al.* Purification of alfa-hemolysin from an overproducing *E. coli* strain. *Molecular and General Genetics*, v. 199, p. 106-110, 1985.

GROSCHUP, M. H.; CUSSLER, K.; WEISS, R., *et al.* Characterization of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Epidemiology and Infection*, v. 107, n. 03, p. 637-649, 1991.

HAROKOPAKIS, E.; HAJISHENGALLIS, G.; GREENWAY, T. E. *et al.* Mucosal immunogenicity of a recombinant *Salmonella typhimurium*-cloned heterologous antigen in the absence or presence of coexpressed cholera toxin A2 and B subunits. *Infection and Immunity*, v. 65, n. 4, p. 1445-1454, 1994.

HESS, J.; GENTSCHEV, I.; MIKO, D. *et al.* Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 93, p. 1458-1463, 1996.

HESS, J.; GRODE, L.; HELLWIG, J. *et al.* Protection against murine tuberculosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the 30-kDa antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 27, p. 283-289, 2000.

HORN, U.; STRITTMATTER, W.; KREBBER, A. *et al.* High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell density fermentation under non-limited growth conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, p. 524-32, 1996.

IMADA, Y., TAKASE, A., KIKUMA, R. *et al.* Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 2121-2126, 2004.

IMADA, Y.; GOJI, N.; ISHIKAWA, H., *et al.* Truncated surface protective antigen (spaa) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 9, p. 4376-4382, 1999.

INGEBRITSON, A. L.; ROTH, J. A.; HAUER, P. J. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Association of spa-type with serotype and role in protective immunity. *Vaccine*, v. 28, n. 13, p. 2490-2496.

JENSEN, E. R.; SHEN, H.; WETTSTEIN, F. O. *et al.* Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle and a probe for studying cell-mediated immunity. *Immunology Reviews*, v. 158, p. 147-157, 1997.

JUAREZ, A.; HUGHES, C.; VOGEL, M. *et al.* Expression and regulation of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*, v. 197, p. 196-203, 1984.

KAREM, K. L.; KANANGAT, S.; ROUSE, B. T. Cytokine expression in the gut associated lymphoid tissue after oral administration of attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Vaccine*, v. 14, n. 16, p. 1495-1502, 1996.

KAUFMANN, S. H. E.; HESS, J. Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development. *Immunology Letters*, v. 65, p. 81-84, 1999.

KENNY, B.; HAIGH, R.; HOLLAND, I. B. Identification of individual amino acids required for secretion within the haemolysin (HlyA) C-terminal targeting region. *Molecular Microbiology*, v.8, p. 1163-1175, 1992.

KITAJIMA; OISHI, E.; AMIMOTO, K., *et al.* Quantitative diversity of 67 kda protective antigen among serovar 2 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its implication in protective immune response. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 62, n. 10, p. 1073-1077, 2000.

KUCSERA, G. R. Proposal for standardization of the designations used for serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* (migula) buchanan. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 23, n. 2, p. 184-188, 1973.

LACHMANN, P. G.; DEICHER, H. Solubilization and characterization of surface antigenic components of *Erysipelothrix rhusiopathiae* t28. *Infection and Immunity*, v. 52, n. 3, p. 818-822, 1986.

LAHIRI, A.; LAHIRI, A.; IYER, N. *et al.* Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. *Microbes and Infection*, v. 12, n. 11, p. 809-818, 2010.

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, v. 14, p. 98-105, 1996.

LILJEQVIST, S.; STAHL, S. Production of subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *Journal of Biotechnology*, v. 73, p. 1-33, 1999.

LOCHT, C. Live bacterial vectors for intranasal delivery of protective antigens. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 3, p. 121-128, 2000.

MACALONEY, G.; DRAPER, I.; PRESTON, J. *et al.* At-line control and fault analysis in an industrial high cell density *Escherichia coli* fermentation, using NIR spectroscopy. *Transactions of the Institution of Chemical Engineers*, v. 74, p. 212-220, 1996.

MAKINO, S.-I.; YAMAMOTO, K.; MURAKAMI, S., *et al.* Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Microbial Pathogenesis*, v. 25, n. 2, p. 101-109, 1998.

MÄRKEL, H.; ZENNECK, C.; DUBACH, A. C. H. *et al.* Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor. *Applied and Microbiology Biotechnology*, v. 39, p. 48-52, 1993.

MASTROENI, P; CHABALGOITY, J. A.; DUNSTAN, S. J. *et al.* *Salmonella*: Immune responses and vaccines. *The Veterinary Journal*, v. 161, p. 132-164, 2000.

MATSUI, T.; YOKOTA, H.; SATO, S. *et al.* Pressurized culture of *Escherichia coli* for a high concentration. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 53, p. 2115-20, 1989.

MCGHEE, J. R.; MESTECKY, J.; DERTZBAUGH, M.T. *et al.* The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*, v. 10, p. 75-88, 1992.

- MEYER, H. O.; LEIST, C.; FIECHTER, A. Acetate formation in continuous culture of *Escherichia coli* K12 D1 on defined and complex media. *Journal of Biotechnology*, v. 1, p. 355-358, 1984.
- MOURIÑO, M.; MUÑO, F.; BALSALOBRE, C. *et al.* Environmental regulation of alfa-hemolysin expression in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, v. 16, p. 249-259, 1994.
- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway*. 7ed. Artmed, 2010.
- NAKANO, K.; RISCHKE, M.; SATO, S. *et al.* Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 48, p. 597-601, 1997.
- NEIDHARDT, F. C.; BLOCH, P. L.; SMITH, D. F. Culture medium for enterobacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 119, p. 736-747, 1974.
- NOEGEL, A.; RDEST, U.; GOEBEL, W. Determination of the functions of hemolytic plasmid pHly152 of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 145, p. 233-247, 1981.
- NORIEGA, F.; FORMAL, S. B.; KOTLOFF, K. L. *et al.* Vaccines against *Shigella* infections Part II: engineered attenuated mutants of *Shigella* as oral vaccines. In: *New Generation Vaccines*, 2.ed. (Levine, M. M. *et al.*, eds), p. 853. Marcel Dekker, New York, 1997.
- OGAWA, Y.; OOKA, T.; SHI, F., *et al.* The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of firmicutes and the organism's intracellular adaptations. *Journal of Bacteriology*, v. 193, n. 12, p. 2959-2971, 2011.
- OGBONNA, J.C.; MÄRKL, H. Nutrient split feeding strategy for dialysis cultivation of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 41, p. 1092-10100, 1993.
- PAALME, T.; TILSMA, K.; KAHRU, A. *et al.* Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, p. 312-319, 1990.
- PASCUAL, D. W.; HONE, D. M.; HALL, S. *et al.* Expression of recombinant enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor antigen I by *Salmonella typhimurium* elicits a biphasic T helper cell response. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 12, p. 6249-6256, 1999.
- REBOLI, A. C.; FARRAR, W. E. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: An occupational pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 2, n. 4, p. 354-359, 1989.
- RIESENBERG, D.; MENZEL, K.; SCHULZ, V. *et al.* High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 34, p. 77-82, 1990.

RYAN, E. T.; BUTTERTON, J. R.; SMITH, R.N. *et al.* Protective immunity against *Clostridium difficile* toxin A induced by oral immunization with a live, attenuated *Vibrio cholerae* vector strain. *Infection and Immunity*, v. 65, p. 2941-2949, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ed. Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SCHMIEL, D. H.; MILLER, V. L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes and Infection*, v. 1, n. 13, p. 1103-1112, 1999.

SCHÜLEIN, R.; GENTSCHEV, I.; SCHLÖR, S. *et al.* Identification and characterization of two functional domains of the hemolysin translocator protein HlyD. *Molecular and General Genetics*, v. 234, p. 155-163, 1992.

SEEGER, A.; SCHNEPPE, B.; MCCARTHY, J. E. G. *et al.* Comparison of temperature- and isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 947-953, 1995.

SHATA, M. T.; STEVCEVA, L.; AGWALE, S. *et al.* Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Molecular Medicine Today*, v. 6, p. 66-71, 2000.

SHILOACH, J.; BAUER, S. High yield growth of *E. coli* at different temperatures in a bench scale fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 17, p. 227– 239, 1975.

SHILOACH, J.; FASS, R. Growing *E. coli* to high cell density: a historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, v. 23, p. 345-357, 2005.

SHIMOJI, Y. Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Virulence factors and protective immunity. *Microbes and Infection*, v. 2, n. 8, p. 965-972, 2000.

SHIMOJI, Y.; MORI, Y.; FISCHETTI, V. A. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Identification of the region responsible for protective immunity. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 4, p. 1646-1651, 1999.

SHIMOJI, Y.; OGAWA, Y.; OSAKI, M., *et al.* Adhesive surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* bind to polystyrene, fibronectin, and type I and IV collagens. *Journal of Bacteriology*, v. 185, n. 9, p. 2739-2748, 2003.

SHIMOJI, Y.; YOKOMIZO, Y.; SEKIZAKI, T., *et al.* Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 7, p. 2806-2810, 1994.

SNEATH, P. H. A.; ABBOTT, J. D.; CUNLIFFE, A. C. The bacteriology of erysipeloid. *British Medical Journal*, v. 2, n. 4739, p. 1063-1066, 1951.

SOLER, E.; HOUDEBINE, L. M. Preparation of recombinant vaccines. *Biotechnology Annual Review*, v. 13, p. 65-94, 2007.

SPRENG, S.; DIETRICH, G.; GOEBEL, W. *et al.* The *Escherichia coli* haemolysin secretion apparatus: a potential universal antigen delivery system in gram-negative bacterial vaccine carriers. *Molecular Microbiology*, v. 31, p. 1596-1598, 1999.

SPRENG, S.; GENTSCHEV, I.; GOEBEL, W. *et al.* Salmonella vaccines secreting measles virus epitopes induce protective immune responses against measles virus encephalitis. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 1687-1692, 2000.

STACKEBRANDT, E.; GENUS, I. *Erysipelothrix*. In: P. D. Vos, G. M. Garrity, *et al.* (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer-Verlag, v.3, 2009. p.1299-1306

STRAW, B.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L., *et al.* *Diseases of swine*. Iowa: Iowa State University Press. 1999

STUDIER, W. F. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, v. 41, p. 207-234, 2005.

SWAN, R.A., LINDSEY, M.J. Treatment and control by vaccination of erysipelas in farmed emus (*Dromaius novohollandiae*). *Australian Veterinary Journal*, v. 76, p. 325-327, 1998.

TIMONEY, J. F.; GROSCHUP, M. M. Properties of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Veterinary Microbiology*, v. 37, n. 3-4, p. 381-387, 1993.

TO, H.; NAGAI, S. Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14, n. 7, p. 813-820, 2007.

TO, H.; SOMENO, S.; NAGAI, S., *et al.* Immunization with truncated recombinant protein SpaC of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain 715 serovar 18 confers protective immunity against challenge with various serovars. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 17, n. 12, p. 1991-1997, 2010.

TOMASZUK-KAZBERUK, A.; KAMIŃSKA M.; B., S., *et al.* Infective endocarditis caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae* involving three native valves. *Kardiologia Polska*, v. 69, n. 8, p. 827-829, 2011.

USHIJIMA, T.; SAKAGUCHI, M.; TOKUNAGA, E., *et al.* Process for producing *Erysipelothrix rhusiopathiae* surface protective antigen mutant in *Escherichia coli*. *Japanese Patent Publication number*. WO2005-083072. SEPT, 09 2005.

VOGEL, M.; HESS, J.; THEN, I. *et al.* Characterization of a sequence (*hlyR*) which enhances synthesis and secretion of hemolysin in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*, v. 212, p. 76-84, 1988.

WAGNER, W.; KUHN, M.; GOEBEL, W. Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions. *Journal of Bacteriology*, v. 154, p. 200-210, 1983.

WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 78, p. 4776-4780, 1990.

WANG, Q.; CHANG, B. J.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 3-4, p. 405-417, 2010.

WATANABE, F., TAKAGI, H., EBISU, S. *et al.* Recombinant subunit vaccine against *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Japanese Patent Publication number*: 2000-279179. OCT 10 2000.

WELCH, R. A. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*, v. 5, p. 521-528, 1991.

WHITE, R. R.; VERWEY, W. F. Isolation and characterization of a protective antigen-containing particle from culture supernatant fluids of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Infection and Immunity*, v. 1, n. 4, p. 380-386, 1970.

WOOD, R. L. *Erysipelas*. In: A. D. Leman (Ed.). *Disease of swine*. Iowa: Iowa State University Press, 1992. p.475-486

WOOD, R. L.; HARRINGTON JR, R. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from swine and from soil and manure of swines pens in the united states. *American Journal of Veterinary Research*, v. 39, n., p. 1833-1840, 1978.

YAMAZAKI, Y.; SATO, H.; SAKAKURA, H., *et al.* Protective activity of the purified protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in pigs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v. 46, n. 1, p. 37-46, 1999.

YOKOMIZO, Y.; WATANABE, F.; IMADA, Y. *et al.* Mucosal immunoadjuvant activity of the low toxic recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin produced by bacillus brevis for the bacterial subunit or component vaccine in pigs and cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 87, n. 3-4, p. 291-300, 2002.

ZABRISKIE, D. W.; ARCURI, E. J. Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enzyme and Microbiology Technology*, v. 8, p. 706-717, 1986.