

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0902944-3 A2**

(22) Data de Depósito: 27/02/2009
(43) Data da Publicação: 05/07/2011
(RPI 2113)



★ B R P I 0 9 0 2 9 4 4 A 2 ★

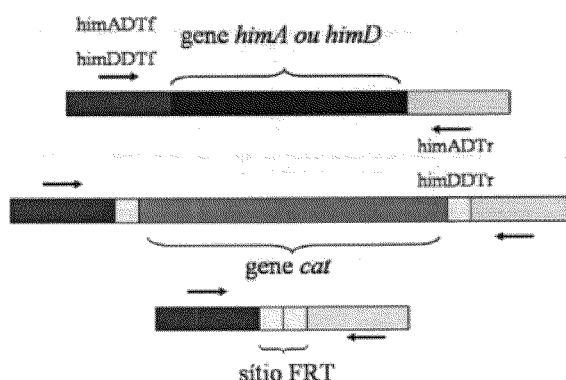
(51) **Int.Cl.:**
A61K 39/112 2006.01
A61P 1/00 2006.01
C12N 15/31 2006.01

(54) **Título: VACINAS COMPREENDENDO LINHAGENS ATENUADAS, PROCESSO DE CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS ATENUADAS, VETORES VACINAIS E SEU USO NO TRATAMENTO DA SALMONELOSE**

(73) **Titular(es):** Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

(72) **Inventor(es):** Fabio Trindade Maranhão Costa, Guilherme Martines Teixeira Mendes, Marcelo Brocchi, Wanderley Dias da Silveira

(57) **Resumo:** Vacinas Compreendendo Linhagens Atenuadas, Processo de Construção de Linhagens Atenuadas, Vetores Vacinais e seu Uso no Tratamento da Salmonelose. A presente invenção revela uma nova alternativa para a prevenção de salmonelose, a partir de mutantes capazes de promover imunização do hospedeiro. Em especial tais mutantes são nulos para os genes *himA* e *himD* de IHF e foram testados quanto a atenuação da virulência e capacidade de desencadear resposta imune efetiva e protetora contra a salmonelose, em especial a salmonelose murina. Logo, a presente invenção está destinada a um processo de produção desta linhagem de mutantes atenuados, capazes de promover imunização, a vetores vacinais e vacinas para o tratamento de salmonelose e a seu uso no combate a tal infecção.





Relatório Descritivo

Vacinas Compreendendo Linhagens Atenuadas, Processo de Construção de Linhagens Atenuadas, Vetores Vacinais e seu Uso no tratamento da Salmonelose

5

Campo da Invenção

A presente invenção revela uma nova alternativa para a prevenção de salmonelose, a partir de mutantes capazes de promover imunização do hospedeiro. Em especial tais mutantes são nulos para os genes *himA* e *himD* de IHF e foram testados quanto a atenuação da virulência e capacidade de desencadear resposta efetiva e protetora contra a salmonelose, em especial a salmonelose murina.

Logo, a presente invenção está destinada a um processo de produção desta linhagem de mutantes atenuados, capazes de promover imunização, a vetores vacinais e vacinas para o tratamento de salmonelose e a seu uso no combate a tal infecção.

Fundamentos da invenção

Salmonella

O gênero *Salmonella* sp pertence à família *Enterobacteriaceae* e é formado por bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos e geralmente flagelados (Mastroeni e Maskell, 2006). A classificação sorológica dessa bactéria fundamenta-se na identificação de antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi), este último quando presente.

Estudos de hibridação de DNA sugerem a existência de duas espécies de *Salmonella*: *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* é subdividida em 7 subgrupos, sendo que a grande maioria das sorovariedades patogênicas para o homem está incluída no subgrupo I (Boyd *et al.* 1996).

As sorovariedades de *S. enterica* patogênicas podem causar, em mamíferos, infecções com diferentes graus de gravidade, desde gastroenterites localizadas na mucosa intestinal até infecções sistêmicas graves, dependendo

da sorovariedade bacteriana e do tipo de hospedeiro envolvido (Salzer *et al.* 2002; Mizuno *et al.* 2007).

S. enterica Typhi é o agente causador da febre tifóide, uma infecção sistêmica grave no homem (Salzer e Whitt, 2002, Sales, 2007). *S. enterica* Choleraesuis causa infecções sistêmicas graves, principalmente em suínos, embora também possa causar infecções em humanos (Salzer e Whitt, 2002, Sales, 2007). *Salmonella enterica* Dublin é uma sorovariedade associada principalmente a bovinos. Como *S. enterica* Typhi em humanos, a sorovariedade Dublin é sempre invasiva e pode causar gastroenterites e septicemia nesses animais (Mizuno *et al.* 2007).

***S. enterica* I 4,[5],12:i:- (STi)**

No Estado de São Paulo, *S. enterica* é uma das bactérias mais freqüentemente associadas a casos de diarreias e/ou infecções sistêmicas em pacientes humanos (Sales, 2007).

Entre Janeiro de 1991 a Dezembro de 2000, estudo realizado pelo Instituto Adolfo Lutz em São Paulo demonstrou que 8,8% dos isolados humanos e 1,6% dos isolados de outras fontes (principalmente de alimentos e animais) de *S. enterica* foram identificados como *S. enterica* I 1,4,[5],12:i:-, uma sorovariedade atípica (Tavechio *et al.*, 2004). Fernandes *et al.* (2006), demonstraram que *S. enterica* I 1,4,[5],12:i:- foi a terceira sorovariedade mais freqüentemente isolada na última década, sendo esta predominante em crianças com idade entre 1 e 4 anos (revisado por Sales, 2007).

Algumas sorovariedades de *S. enterica*, como Typhimurium (ST), exibem a habilidade de mudar o tipo de flagelina expresso, fenômeno este denominado de variação de fase flagelar (revisado por Henderson *et al.*, 1999). *S. enterica* Typhimurium, por exemplo, expressa dois tipos de proteínas flagelares antigênicas, codificadas pelos genes *fliC* e *fljB*, que são denominadas na nomenclatura sorológica como “i” e “1,2,” respectivamente (Sales, 2007). Isso explica a denominação sorológica de *S. enterica* Typhimurium como I 1,4,[5],12:i:1,2. A flagelina FliC é denominada flagelina de fase 1 e a flagelina FljB de fase 2.

Embora *S. enterica* I 4,[5],12:i:- (STi) apresente características sorológicas e fisiológicas semelhantes a *S. enterica* Typhimurium (I 4,[5],12:i:1,2), não apresenta a variação de fase flagelar característica desta última. Ikeda *et al.* (2001) demonstraram que mutantes de *S. enterica* Typhimurium expressando somente o antígeno de fase 2 (FljB) eram atenuados, enquanto os mutantes que expressavam apenas o antígeno de fase 1 (FliC) eram tão virulentos quanto a linhagem selvagem.

Salmonelose e doença

A Salmonelose é uma das doenças infecciosas mais freqüentes tanto em humanos quanto em outros animais (Salehi *et al.* 2007). A infecção por *S. enterica* inicia-se com a ingestão de água ou alimentos contaminados, particularmente alimentos derivados de aves e suínos. Estes microrganismos são patógenos intracelulares facultativos e, uma vez ingeridos, apresentam a capacidade de aderir e invadir células da mucosa intestinal, preferencialmente células M (Jones *et al.*, 1994). Uma vez ultrapassada a mucosa intestinal, *S. enterica* invade, persiste e prolifera no interior de vacúolos de células do sistema retículo endotelial podendo assim, alcançar diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro, causando infecção sistêmica (Salyer e Whitt, 2002). Estas infecções representam, ainda hoje, um grave problema de saúde pública, devido sua alta incidência e gravidade, principalmente em áreas subdesenvolvidas do mundo, onde as condições de higiene e saneamento básico são ainda precárias (Hofer e Reis, 1994; Boyle *et al.*, 2007).

No Brasil, a salmonelose é um problema muito sério especialmente devido à qualidade precária do saneamento básico em regiões mais pobres e falta de noções sobre higiene pessoal e com o manuseio de alimentos (Fernandes *et al.* 2006, Ghilardi *et al.*, 2006).

A dose infectante média (DI₅₀) de *S. enterica* capaz de produzir infecções clínicas ou subclínicas em humanos está entre 10⁵-10¹⁰ organismos ingeridos. O processo infeccioso é localizado no íleo, cólon e linfonodos mesentéricos e comumente manifesta-se dentro de 12-72 horas após a ingestão de alimento contaminado, com o aparecimento de diarreia, vômito e

dores abdominais (Santos *et al.*, 2001). A maioria dos casos de gastroenterites ocorre em crianças com menos de 10 anos de idade, e os sintomas tendem a ser mais severos neste grupo, podendo a infecção tornar-se sistêmica.

Uma importante barreira encontrada por *S. enterica* no processo infeccioso, após sua passagem pelo epitélio intestinal, são os macrófagos da submucosa. (Sano *et al.*, 2007). Estes detectam e internalizam o patógeno bacteriano a fim de eliminá-lo do hospedeiro.

As sorovariedades de *S. enterica*, capazes de causar infecção sistêmica, invadem os macrófagos, através de macropinocitose, e então ativam mecanismos de virulência que permitem a evasão das funções microbicidas do fagócito, permitindo a sobrevivência e replicação no ambiente intracelular (Alpuche-Aranda, *et al.*, 1994, Sales, 2007). A migração de macrófagos infectados para outros órgãos do sistema monocítico fagocitário facilita a disseminação da bactéria no hospedeiro.

15 ***Salmonella* e Vacinas**

A busca por uma vacina efetiva contra a febre tifóide compõe um importante capítulo na historia da Microbiologia. Várias estratégias e formulações vacinais foram testadas tais como bacterinas, vacinas de subunidades e linhagens vivas atenuadas (revisado por Guzman *et al.*, 2006). O antígeno capsular Vi purificado, livre ou conjugado com proteínas 20 carreadoras é imunogênico quando administrado por via intramuscular ou subcutânea e tem se mostrado eficaz em alguns estudos (Guzman *et al.*, 2006; Strugnell e Wijburg, 2006). Contudo, devido a suas características e modo de administração, é incapaz de induzir o sistema imune ao nível de mucosa 25 (MALT, do inglês *mucosal associated lymphoid tissue*). Desta maneira, esforços foram canalizados no desenvolvimento de vacinas constituídas por linhagens vivas atenuadas, ideais para induzir resposta imune ao nível do MALT.

A primeira vacina viva atenuada desenvolvida contra a febre tifóide é 30 composta pela linhagem *S. enterica* Typhi Ty21a. Esta linhagem foi obtida por mutagênese química da linhagem parental Ty2 (Germanier e Fürer, 1983). Esta

vacina oral é segura, mas devido a sua grande atenuação, requer várias doses para induzir imunidade, que freqüentemente é de curta duração (Guzman *et al.*, 2006; Strugnell e Wijburg, 2006). Não obstante, a linhagem Ty21a compõe a única vacina viva atenuada contra a febre tifóide licenciada para uso em humanos, comercializada com o nome de Vivitof pela Bernabiotech Ltd da Suíça (Strugnell e Wijburg, 2006).

Os resultados alcançados com a linhagem Ty21a levaram vários grupos a construir novas linhagens vacinais de *S. enterica*, contendo deleções em genes alvo específicos que atenuaram a virulência. Adicionalmente, essas linhagens apresentam uma característica fundamental para vacinas vivas, a estabilidade da atenuação, uma vez que a mesma foi alcançada por deleção de um ou mais genes (revisado por Guzman *et al.*, 2006). Esses mutantes foram construídos inicialmente em *S. enterica* Typhimurium, devido à disponibilidade do modelo murino de infecção, sendo as mutações promissoras transferidas para linhagens de *S. enterica* Typhi, muitas vezes a própria Ty2 (revisado por Guzman *et al.*, 2006). Sendo assim, linhagens $\Delta aroA$, $\Delta aroC$, $\Delta aroD$ de *S. enterica*, deficientes na via biossintética dos aminoácidos aromáticos (Tacket *et al.*, 1997), mutantes Δcya Δcrp , incapazes de expressar adenilato ciclase e o receptor para cAMP (Tacket *et al.*, 1997), mutantes *phoP-phpQ* (Hohmann *et al.*, 1996) entre outros, foram construídos e demonstraram-se imunogênicos, apesar da atenuação da virulência. No entanto, com freqüência, testes em voluntários humanos indicaram a ocorrência de bacteremia e/ou a necessidade de várias doses para a indução de imunidade (Guzman *et al.*, 2006; Strugnell e Wijburg, 2006). De fato, diversos estudos têm demonstrado o desafio de se ajustar o grau de atenuação da linhagem vacinal para, de um lado, não comprometer a resposta imune e de outro, ser livre de efeitos colaterais. Desta forma, apesar de todos os esforços, ainda não existe uma formulação vacinal totalmente efetiva na proteção contra a febre tifóide.

A capacidade de invadir, sobreviver e proliferar no interior de macrófagos, polimorfonucleares e células dendríticas, aliada à disponibilidade de mutantes atenuados fazem de *S. enterica* um excelente carreador de

antígenos a células do sistema imune. Assim, linhagens atenuadas de *S. enterica* podem ser manipuladas geneticamente de tal forma a expressar antígenos heterólogos, construindo-se linhagens vacinais multifatoriais. Diferentes antígenos derivados de outras bactérias, vírus, fungos, parasitas e mesmo de células de mamífero foram expressos em linhagens vacinais de *S. enterica*. Estas linhagens foram capazes de induzir resposta imune protetora não somente contra a Salmonelose, mas também contra o organismo doador do antígeno heterólogo (Cheminay e Hensel, 2007; Kwon *et al.*, 2007; Loessner *et al.*, 2007; Mahoney *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2006). Uma característica fundamental de tais linhagens é, além da impossibilidade de reversão da atenuação, discutida anteriormente, a capacidade de expressar o antígeno heterólogo de forma estável e em quantidades suficientes para induzir o sistema imune.

No início, a clonagem e expressão de antígenos em *S. enterica* eram alcançadas através da utilização de plasmídios carregando genes de resistência a antibióticos (Cárdenas e Clements, 1992). Alguns estudos demonstraram, no entanto, que na ausência de pressões seletivas, tais plasmídios eram instáveis e, portanto, perdidos após poucos ciclos de replicação *in vivo* (Cárdenas e Clements, 1992; Dunstan *et al.*, 2003) ou até mesmo durante o cultivo *in vitro* (Everest *et al.*, 1995).

Para resolver tais problemas, estratégias como a utilização de promotores induzidos *in vivo* no controle de expressão do antígeno (Cheminay e Hensel, 2007; Marshall *et al.*, 2000), construção de sistemas letais balanceados (Curtiss *et al.*, 1990; Everest *et al.*, 1995) ou a integração do gene heterólogo no cromossomo de *S. enterica* (Hone *et al.*, 1988; Strugnell *et al.*, 1990; Everest *et al.*, 1995) foram descritos.

IHF e o nucleóide bacteriano

Bactérias contêm proteínas do tipo *histona-like* que compõem o nucleóide bacteriano juntamente com o DNA cromossômico. Diferente das histonas de eucariotos, as “histonas” bacterianas parecem não formar com o DNA complexos análogos aos nucleossomas (Thanbichler *et al.*, 2005). Dentro

deste grupo encontram-se 12 proteínas bacterianas que foram descritas como *histone-like* ou *nucleoid-associated* (Mangan *et al.*, 2006). Dentre as proteínas dessa categoria, as mais bem estudadas são HU, FIS, IHF, HNS e DPS (Drlica, 1997; Mangan *et al.*, 2006, Cróinín e Dorman *et al.*, 2007).

5 A proteína IHF é um heterodímero sendo composta pelas subunidades α (IHF- α) e β (IHF- β), que são polipeptídios termoestáveis presentes na célula bacteriana em quantidades equimolares e codificados pelos genes *himA* e *himD*, respectivamente. A expressão de IHF é aumentada na fase estacionária de crescimento e vários genes importantes para a sobrevivência bacteriana
10 nesta fase estão sob o controle positivo do mesmo (Ishihama, 2000). Apesar de apresentar menor afinidade de ligação ao DNA se comparada a outras proteínas ligantes de DNA, IHF desempenha importante função biológica (Ali *et al.*, 2001). IHF impõe ao DNA curvaturas de aproximadamente 180° (Lorenz *et al.*, 1999), sendo essa habilidade capaz de induzir importantes alterações
15 topológicas relevantes à organização do nucleóide (Thanbichler *et al.*, 2005), funcionando assim como cofator em numerosos processos regulatórios (Goosen e van de Putte, 1995).

O sistema de recombinação λ *Red*

Em bactérias entéricas, a obtenção de recombinantes utilizando
20 moléculas lineares de DNA é um evento altamente raro, devido à instabilidade da molécula de DNA linear, que uma vez no interior da célula é rapidamente degradada pela atividade de nucleases (ExoV) do sistema de recombinação RecBCD. Para contornar esta dificuldade, sistema baseado no uso da maquinaria de recombinação do bacteriófago λ (o sistema λ *Red*) foi
25 recentemente proposto.

Datsenko e Wanner (2000) descreveram a construção e o emprego de um sistema baseado em λ *Red* na construção de linhagens mutantes de bactérias entéricas. Este sistema é composto pelo plasmídio pKD46 e por plasmídios assessórios, utilizados na construção de cassetes de recombinação
30 por PCR (Datsenko e Wanner. 2000).

Durante a busca de anterioridade, o documento US 2004/101531 reivindica a deleção dos genes Cya e Crp de *Salmonella*. Embora a estratégia da presente invenção tenha sido similar, a deleção ocorreu em outro gene chamado ihf que conferiu atenuação da bactéria e conseqüente aplicação como vetor vacinal.

Portanto, pode-se ver que uma estratégia de imunização baseada no silenciamento gênico de ihf não foi descrita nem sequer sugerida pelo estado da técnica.

Breve Descrição da Invenção

O emprego de linhagens bacterianas vivas atenuadas comovacina está historicamente associado à indução de resposta imunológica efetiva e persistente. O vetor vacinal constitui de uma bactéria que expressa antígenos (proteínas) de outras espécies de microorganismos obtidos através do método de DNA recombinante. Estes organismos apresentados ao sistema imune da pessoa ou animal (organismo alvo) estimulam a produção de anticorpos contra a doença de interesse sem que ela cause sintomas ou danos graves ao hospedeiro.

Em um primeiro aspecto, a presente invenção proporciona a construção de mutantes nulos de *S. enterica* para os genes (*himA* ou *himD*) codificadores de IHF (*Integration host factor*) com o intuito de desenvolver linhagens atenuadas quanto a virulência, mas capazes de causar infecção transitória e induzir o sistema imune de forma efetiva, constituindo-se em potenciais linhagens vacinais.

É um objeto da presente invenção vetores vacinais compreendendo pelo menos uma sequência capaz de silenciar pelo menos um gene codificador de IHF em uma bactéria patogênica.

É um adicional objeto da presente invenção um processo de produção de uma bactéria atenuada compreendendo as etapas de:

- a) Acredito que este sistema não possa ser patenteado uma vez que é de domínio público e não foi nosso grupo que o desenvolveu.
- b) troca

alélica do gene codificador de IHF pelo cassete de recombinação compreendendo um gene acessório; e

c) eliminação do gene acessório presente no cassete de recombinação.

É um adicional objeto da presente invenção uma bactéria atenuada compreendendo pelo menos um gene codificador de IHF silenciado em uma bactéria patogênica.

É um adicional objeto da presente invenção uma vacina baseada em bactérias atenuadas compreendendo pelo menos um gene codificador de IHF silenciado em uma bactéria patogênica, capaz de induzir e estimular uma resposta imune no hospedeiro vertebrado.

Estes e outros objetos da presente invenção serão mais bem detalhados de acordo com as figuras e descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1 – Gel de agarose 1% mostrando o Cassete de recombinação gerado por PCR utilizando os primers *himA-f* e *himA-r*.

Figura 2 – Gel de agarose 1% mostrando o produto de amplificação por PCR do gene *cat* presente em *STi607ΔhimA:cat*, *STi607ΔhimD:cat*, *ST662ΔhimA:cat*, *ST662ΔhimD:cat* com os iniciadores *cmDTf* e *cmDTr*.

Figura 3 – Esquema demonstrando a deleção dos genes *himA* e *himD* e a posição dos iniciadores *himADTf*, *himADTr*, *himDDTf* e *himDDTr*.

Figura 4 – Locus *himA* de *STi607* seqüenciado com os iniciadores *himADTf* e *himADTr*. Em amarelo a região que foi preservada e em cinza a região removida por troca alélica com o cassete de recombinação. Não confundir o esquema de cores com a deleção de *himA*. No caso da linhagem selvagem *STi607*, o gene *himA* está intacto.

Figura 5 – Locus do gene *himA* de *STi607ΔhimA* seqüenciado com os iniciadores *himADTf* e *himADTr*. Em amarelo a região que foi preservada, em azul a posição do iniciados *himAf* e em verde do iniciador *himAr*. A região em vermelho corresponde aos sítios FRT presentes no cassete de recombinação.

Notem a ausência da seqüência interna do gene *himA*, em cinza na Figura 4.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos a seguir não têm o intuito de limitar o escopo da invenção, mas sim de somente ilustrar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção.

Bactéria Patogênica

As bactérias patogênicas de acordo com a presente invenção são bactérias capazes de provocar doenças e/ou morte em seus hospedeiros. Exemplos de bactérias patogênicas incluem, sem limitações, bactérias gram negativas, em especial membros das famílias *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Francisellaceae*, *Legionellales*, *Pseudomonadaceae* ou *Pasteurellaceae*, incluindo os gêneros *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia* spp., *Yersinia* spp., e *Vibrio* spp. Em especial, bactérias patogênicas da presente invenção são escolhidas dentre as espécies que possuem em seu genoma pelo menos um gene codificador de IHF, preferencialmente *S. enterica*, sorovar Typhimurium (ST662) e outra a variante I 4,[5],12:i:- (STi607).

Gene codificador de IHF

O gene codificador de IHF da presente invenção é uma sequência de DNA que apresenta homologia de pelo menos 80% com pelo menos uma sequência escolhida dentre *himA* ou *himD*.

Bactéria Atenuada

Para efeitos da presente invenção, entende-se como bactéria atenuada uma bactéria patogênica que possui pelo menos um gene codificador de IHF silenciado.

Por “silenciamento” entende-se um processo de deleção de determinada sequência do genoma de uma bactéria. Em especial, o silenciamento foi proporcionado por um cassete de recombinação.

Cassete de recombinação

O cassete de recombinação de acordo com a presente invenção é um cassete compreendendo pelo menos uma sequência capaz de silenciar pelo menos um gene codificador de IHF em uma bactéria patogênica.

O cassete de recombinação é composto por iniciadores, que possuem 2 partes contínuas, sendo a primeira uma seqüência de aproximadamente 40 bases homólogas ao gene alvo e a segunda aproximadamente 20 bases homólogas a uma região presente nos plasmídeos a serem utilizados.

5 As regiões de homologia com o gene codificador de IHF foram selecionadas com base na seqüência do banco de dados do projeto Genoma *S. enterica* (NC_003197) (Washington University, St. Louis, USA) e escolhidas de modo que fossem próximas aos códons de iniciação e terminação do gene.

10 O cassete de recombinação compreende ainda genes acessórios, como genes de resistência a antibióticos.

Processo de Transformação e Recombinação

O processo de recombinação das bactérias da presente invenção é um processo que se baseia no sistema de recombinação λ *Red*. O sistema de recombinação λ *Red* do bacteriófago λ inclui 3 genes: γ , β e *exo* (todos presentes no plasmídio pKD46), que codificam respectivamente Gam, Bet e Exo. Gam inibe o sistema ExoV do hospedeiro, enquanto Bet e Exo promovem a recombinação de fragmentos lineares no DNA alvo (Datsenko *et al.* 2000). Os plasmídios acessórios contêm genes de resistência a antibióticos (Km^R ou Cm^R) flanqueados por sítios FRT (*FLP recombinase recognition targets*), formando o módulo de recombinação. Assim, estes plasmídios são utilizados na criação do cassete de recombinação.

25 Para a geração do cassete de recombinação, seqüências de aproximadamente 30 pb homólogas ao gene alvo são geradas nas extremidades desse módulo por PCR. Assim, o cassete de recombinação nada mais é do que o módulo flanqueado por seqüências homólogas ao gene alvo.

30 Para a geração de mutantes, o plasmídio pKD46 é transformado por eletroporação na linhagem hospedeira e os transformantes são submetidos a eletroporação com o cassete de recombinação. A expressão dos genes γ , β e *exo* irá inibir a degradação da fita linear de DNA e permitir a recombinação do cassete a partir do reconhecimento das seqüências FRT. Esta recombinação obedece à homologia de DNA conferida pelas seqüências flanqueadores de tal

forma que a recombinação irá envolver seqüências homólogas. Os recombinantes são então selecionados utilizando as marcas de resistências carreadas pelo módulo de recombinação. Essas construções permitem uma subsequente remoção do cassete de resistência pela FLP recombinase expressa por um gene plasmídial, no caso o plasmídio pCP20. Desta forma, é possível construir deleções ou inserções de genes em bactérias entéricas, utilizando fragmentos de DNA lineares, gerados por PCR.

Em especial, o processo de transformação da presente invenção compreende as etapas de:

- 10 a) recombinação da bactéria patogênica com um bacteriófago que iniba o sistema ExoV do hospedeiro e promova a recombinação de fragmentos lineares no DNA alvo;
- b) troca alélica do gene codificador de IHF pelo cassete de recombinação compreendendo um gene acessório; e
- 15 c) eliminação do gene acessório presente no cassete de recombinação.

Exemplo 1 - Meios de cultura e antibióticos

1.1 - Meio MEM

O meio de cultura para células animais, meio MEM, foi utilizado segundo formulação fornecida pela NUTRICELL® (Campinas – SP).

20 1.2 - Meio Luria Bertani (LB) (Sambrook e Russel, 2001).

Triptona (Difco).....	10% (w/v)
Cloreto de Sódio(Merck).....	10% (w/v)
Extrato de Levedura (Difco).....	5% (w/v)
Água destilada/deionizada q.s.p.....	(v)

25 1.3 - Meio Luria Bertani – Agar (LB-ágar).

Para o preparo do meio LB-agar foram adicionados de 1,5 a 2% (w/v) de ágar bacteriológico (Difco®) em meio LB. Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos.

1.4 - Meio SOB (Ausubel *et al.* 2003).

30 Triptona. (Difco).....	2% (w/v)
Extrato de levedura (Difco).....	0,5% (w/v)

NaCl (Merck).....10 mM

KCl (Merck).....2,5 mM

Água destilada/deionizada q.s.p.....(v)

Este meio foi esterilizado por autoclavagem conforme descrito acima.

5 **1.5 - Meio SOC.**

Extrato de Levedura (Difco).....0,5% (w/v)

Triptona. (Difco).....2,0% (w/v)

NaCl (Merck).....10 mM

KCl (Merck).....2,5 mM

10 MgCl₂ (Merck).....10 mM

MgSO₄ (Merck).....10 mM

Glicose (Merck).....20 mM

Água destilada/deionizada q.s.p.....(v)

Este meio foi esterilizado por autoclavagem conforme descrito acima.

15 **1.6 - Meio Agar Mac Conkey.**

O meio de cultura utilizado foi o da formulação fornecida pela Oxoid® (Cambridge, UK).

1.7 - Meio mínimo para cultura bacteriana (Ausubel et. al. 2003)

Meio M9 5X

20 Na₂HPO₄ (Merck).....30g

KH₂PO₄ (Merck).....15g

NH₄Cl (Merck).....5g

NaCl (Merck).....2,5g

CaCl₂ (Merck).....15mg

25 Água destilada/deionizada q.s.p.....989 mL(v)

Esta solução foi esterilizada por autoclavagem conforme descrito acima.

Diluir os sais em água destilada/deionizada esterilizada para 1X:

Adicionar 1 ml de solução MgSO₄.7H₂O 1M e 10 mL de solução de glicose 20%. Volume final de 1000 mL.

30 **1.8 - Meio mínimo – agar para cultura bacteriana (Ausubel et. al. 2003)**

O meio mínimo-agar foi preparado adicionando-se 2% de agar

bacteriológico ao meio mínimo (Ausubel *et. al.* 2003).

1.9 - Antibióticos

Os antibióticos ampicilina (100µg/mL), cloranfenicol (25µg/mL), kanamicina (50µg/mL), estreptomicina (50 µg/mL), tetraciclina (50 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL), quando requeridos, foram utilizados nas concentrações descritas em Sambrook e Russell (2001).

Exemplo 2 - Soluções

2.1 - Tampão Salina Fosfatada (PBS) 0,01 M

	Cloreto de Sódio.....	8,00g
10	KCl.....	0,20g
	KH ₂ PO ₄	0,02g
	NaHPO ₄ . 12H ₂ O.....	2,89g
	Água destilada/deionizada..q.s.p.....	1000,00mL

Esta solução foi esterilizada por autoclavagem conforme descrito anteriormente.

2.2 - Solução de ATV (Associação Tripsina-Versene)

A solução foi a da formulação fornecida pela NUTRICELL® (Campinas-SP).

2.3 - Solução Penicilina – Estreptomicina

	Penicilina G Potássica.....	60.000.000 U
20	Estreptomicina.....	60g
	Hanks 1X esterilizado.....	6000mL

A solução foi a da formulação fornecida pela NUTRICELL® (Campinas-SP).

Marcador de peso molecular para ácidos nucleicos

O marcador de peso molecular padrão utilizado foi o GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas®, São Paulo-SP).

Termociclador e Taq DNA polimerase

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas no termociclador MJ Research PTC- 200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Waltham, MA). Para minimizar a ocorrência de erros foi utilizada enzima Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen®, São Paulo-SP).

Exemplo 3 - Linhagens Bacterianas e Mutagênese

3.1 - Linhagens bacterianas selecionadas para mutagênese.

Neste estudo foram selecionadas duas linhagens selvagens de *S. enterica*, uma sorovar Typhimurium (ST662) e outra a variante I 4,[5],12:i.-. (STi607), isoladas de pacientes com quadro clínico de salmonelose que deram entrada no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto (Sales, 2007).

As amostras selecionadas foram estocadas em glicerol 2,5 M, segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001).

3.2 - Teste de sensibilidade das linhagens de *S. typhimurium* a antibióticos.

Foram testadas a susceptibilidade das linhagens selecionadas para ampicilina, kanamicina, cloramphenicol, estreptomicina e tetraciclina. Para isso, foi utilizado o método de microdiluição conforme descrito pelo CLSI (CLSI, 2005).

Neste teste foi possível observar uma Concentração Inibitória Mínima (MIC) inferior a 10µg/mL para os antibióticos ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina e MIC num intervalo de 10-25 µg/mL para kanamicina, para ambas linhagens de *S. enterica*. Este teste indicou que plasmídios com marcas de resistência a ampicilina e ao cloranfenicol poderiam ser utilizados.

3.3 - Sistema utilizado para mutagênese.

A mutagênese dos genes *himA* e *himD* foi obtida pelo sistema λ Red conforme descrito por Datsenko e Wanner (2000). Este sistema é constituído das linhagens e plasmídios demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Linhagens bacterianas com seus respectivos plasmídios pertencentes ao sistema λ Red.

Linhagem	Plasmídio	Referência
BT340	pCP20	Datsenko e Wanner, 2000
BW25113	----	Datsenko e Wanner, 2000
BW25141	----	Datsenko e Wanner, 2000
BW25141	pKD3	Datsenko e Wanner, 2000
BW25141	pKD4	Datsenko e Wanner, 2000
BW25141	pKD13	Datsenko e Wanner, 2000
BW25113	pKD46	Datsenko e Wanner, 2000
BW26513	----	Datsenko e Wanner, 2000

5 Extração e purificação de plasmídeos.

Do estoque à -80°C foi retirada uma amostra de cada cepa contendo os plasmídios. A linhagem BW25113/pKD46 foi semeada em meio LB ágar contendo ampicilina (100µg/mL); BW25141/pKD3 e BT340/pCP20 foram
 10 semeadas em meio LB ágar contendo ampicilina (100µg/mL) e chloramphenicol (25µg/mL); BW25141/pKD4 e BW25141/pKD13 semeadas em meio LB ágar contendo ampicilina (100µg/mL) e kanamicina (50 µg/mL).

Foram feitas algumas modificações no protocolo sugerido pelo fabricante do kit para extração e purificação de plasmídios para a extração de pKD46 e pCP20. Para esses plasmídios, a temperatura de incubação utilizada
 15 foi 30° C, uma vez que tais plasmídios contêm origem de replicação termo-sensível. Após a extração, os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (Sambrook e Russell, 2001).

Iniciadores utilizados para gerar os cassetes de recombinação.

Os iniciadores para essa metodologia são compostos de 2 partes
 20 contínuas, sendo a primeira uma seqüência de aproximadamente 40 bases homólogas ao gene alvo e a segunda 20 bases homólogas a uma região presente nos plasmídeos pKD3, pKD4 e pKD13. (Datsenko e Wanner, 2001).

A região utilizada para amplificar a seqüência contida no plasmídio foi selecionada através do programa Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), baseado na seqüência do plasmídio pKD3
 25

(AY048742) (Datsenko e Wanner, 2001). Desse modo, foram desenhados os iniciadores *himA-f*, *himA-r*, *himD-f* e *himD-r*, descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – sequência dos iniciadores utilizados para mutagênese

Iniciador	Seqüência	Referência
<i>himA-f</i>	5'-GCGCTTACAAAAGCTGAAATGTCAGAATATCTGTTTGATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'	Este estudo
<i>himA-r</i>	5'-CGCAATACACCCTGATGGATGTTATGCCTGGATCTGATTACATATGAATATCCTCCTTAGTTC-3'	Este estudo
<i>himD-f</i>	5'-CAGCCAATTGCTTTAAGGAACCGGAGGAATCATGACCAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'	Este estudo
<i>himD-r</i>	5'-TTTTTCGGGTTCAAGTTTTGCGTTAAACTTAACCGTAAATCATATGAATATCCTCCTTAGTTC-3'	Este estudo

5

Construção do cassete de recombinação por PCR.

Para a construção do cassete de recombinação foram utilizados os iniciadores descritos anteriormente, para a amplificação de uma região do plasmídeo pKD3. As reações foram realizadas em volume final de 50 µL
10 contendo 20 pmol de cada iniciador, 20 a 30 ng de DNA plasmidial, 1mM de cada dNTP, 2U de Taq DNA polimerase e 2 mM de MgCl₂ em tampão apropriado provido com a enzima.

Para a reação de PCR, o DNA plasmidial foi desnaturado por aquecimento a 94° C por 2 minutos, e a amplificação realizada em 35 ciclos
15 constituída dos seguintes passos: (1) desnaturação a 94° C por 30 segundos; (2) “anelamento” a 56° C por 30 segundos; (3) extensão a 72° C por 1 minuto e 30 segundos. Procedeu-se uma extensão final por 5 minutos. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook e Russell, 2001).

20 Assim, os primers *himA-f*, *himA-r*, *himD-f* e *himD-r* foram utilizados para amplificar uma região de aproximadamente 1,2 Kbp (Figura 1) do plasmídeo pKD3. A região amplificada foi utilizada para compor o cassete de recombinação com os genes *himA* e *himD*, respectivamente. Por amplificarem a mesma região do plasmídeo molde ambos os cassetes de recombinação
25 possuem o mesmo tamanho. Desta forma, na Figura 1 está demonstrado apenas o cassete de recombinação gerado por PCR utilizando os primers *himA-f* e *himA-r*.

Transformação das linhagens de *S. enterica* Typhimurium com o plasmídeo pKD46.

A transformação das linhagens selecionadas com o plasmídeo pKD46 foi realizada por eletroporação, seguindo protocolo descrito em Ausubel *et al.* (2003). O eletroporador (*Eletroporador Bio Rad. Gene Pulser II*, Hercules - CA, USA) foi ajustado para 1,5 KV, 25 μ F e 200 ohms. Para tal finalidade, foram utilizadas cubetas de 0,1 cm. Após 2 horas de incubação em meio SOC, as amostras submetidas a eletroporação foram plaqueadas em meio LB ágar provido de ampicilina (100 μ g/mL) e incubadas à 30°C durante a noite.

A presença deste plasmídeo foi avaliada pela análise do perfil plasmidial por eletroforese em gel de agarose. Das colônias crescidas foram selecionadas três de cada linhagem para a continuidade do experimento, sendo denominadas linhagem STi607/pKD46 e linhagem ST662/pKD46. As linhagens selecionadas foram estocadas em glicerol 2,5M segundo protocolo proposto por Sambrook e Russell (2001).

Troca alélica dos genes *himA* e *himD* pelo cassete de recombinação.

Para a etapa de recombinação gênica foram utilizadas as linhagens STi607/pKD46 e ST662/pKD46, como descrito anteriormente, e o cassete de recombinação gerado por PCR.

O preparo das células competentes foi feito partindo-se de um pré-inóculo em tubo de polipropileno de 15 mL contendo 5 mL de meio LB com ampicilina (100 μ g/mL), que foi incubado durante a noite à 30° C sob agitação (150 rpm). Desta cultura, foi retirado 0,4 mL que foi inoculado em 40 mL de meio LB com o mesmo antibiótico, na mesma concentração e 1mM de L-arabinose (Sigma), usado como indutor da expressão dos genes γ , β , e *exo*, sendo esta nova cultura crescida à 30° C sob agitação (150 rpm) até atingir D.O₆₀₀ de 0,7. Os frascos foram resfriados em banho de gelo por 15 minutos e então as culturas foram centrifugadas por 10 minutos à 5000 g (4° C). O precipitado foi ressuspensionado em 4 mL de água deionizada esterilizada previamente resfriada a 4° C e centrifugado novamente nas mesmas condições. Esta etapa de lavagem foi repetida 3 vezes. O sedimento formado

após a última lavagem foi ressuspendido em 400 µL de glicerol 10% gelado (Sambrook e Russell, 2001) e distribuído em alíquotas de 90 µL em tubos de microcentrifuga.

Foram selecionados 3 tubos contendo as alíquotas aos quais foram adicionados 10 µL do produto gerado pela PCR; esses foram colocados em gelo por 1 minuto. O eletroporador foi ajustado para 1,5 KV, 25 µF e 200 ohms e as amostras eletroporadas e recolhidas em meio SOC, onde foram incubadas à 37° C por 2 horas e posteriormente plaqueadas em meio LB-ágar provido de cloramphenicol (25µg/mL). As culturas foram incubadas durante a noite à 37° C. Das colônias crescidas, foi selecionada uma de cada linhagem para a continuidade do experimento, sendo denominadas linhagens STi607*himAcm*^R, STi607*himDcm*^R, ST662*himAcm*^R e ST662*himDcm*^R. As colônias selecionadas foram estocadas em glicerol 2,5M segundo protocolo proposto por Sambrook e Russell (2001).

15 **Eliminação do gene *cat* de resistência ao antibiótico.**

Para a eliminação do gene de resistência ao antibiótico, foram utilizadas células competentes preparadas das linhagens STi607*himA:cat*, STi607*himD:cat*, ST662*himA:cat* e ST662*himD:cat*, como descrito anteriormente, e o plasmídeo pCP20. A eletroporação foi feita conforme descrito anteriormente e os transformantes foram selecionados em placas de LB-agar com ampicilina (100µg/mL). As placas foram incubadas durante a noite à 30° C. Das colônias crescidas foi selecionada uma de cada amostra, sendo denominadas STi607Δ*himA*, STi607Δ*himD*, ST662Δ*himA* e ST662Δ*himD*. Estas linhagens foram estocadas em glicerol 2,5M como descrito anteriormente (Sambrook e Russell, 2001).

Exemplo 4 - Detecção e caracterização das mutações em *himA* e *himD* por PCR.

Detecção do gene *cat*

O gene *cat* (*chloramphenicol acetyl transferase*) nos mutantes de *S. enterica* foi inicialmente detectado por PCR, antes da eliminação do cassete de recombinação. Foi desenhado um par de iniciadores internos a este gene,

tendo-se como base a sequência do plasmídio pKD3 (AY048742) (Datsenko e Wanner, 2001) e constituinte do cassete de recombinação. Estes foram desenhados com o software Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Estes iniciadores são mostrados na Tabela 3.

5

Tabela 3 – Sequência dos iniciadores utilizados para detecção do gene *cat*

Iniciador	Sequência	Referência
cmDT - f	5' - GAACTTCGGAATAGGAACTTCA - 3'	Este estudo
cmDT - r	5' - TGTGACGGAAGATCACTTCG - 3'	Este estudo

As reações foram realizadas em volume final de 50 µL contendo 20 pmol de cada iniciador, 20 a 30 ng de DNA genômico de cada transformante, 1mM de cada dNTP, 2U de Taq DNA polimerase e 2 mM de MgCl₂ em tampão apropriado provido com a enzima.

Para a reação de PCR, o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 94° C por 2 minutos e a amplificação realizada em 35 ciclos constituída dos seguintes passos: (1) desnaturação a 94° C por 30 segundos; (2) “anelamento” a 55° C por 30 segundos; (3) extensão a 72° C por 1 minuto. Procedeu-se uma extensão final por 5 minutos. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook e Russell, 2001). Observa-se na Figura 2 que as linhagens STi607 e ST662 não apresentaram amplificação para esse gene. Todas as linhagens mutantes apresentaram o mesmo perfil eletroforético.

Deteção das mutações por iniciadores externos aos genes *himA* e *himD*

Foram construídos dois pares de iniciadores externos aos genes *himA* e *himD* para a detecção de sua mutagenese (Tabela 4). Esses foram desenhados com o software Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), baseado na sequência de *S. enterica* Typhimurium LT2 (NC_003197).

25

Tabela 4 – Sequência dos iniciadores externos aos genes *himA* e *himD*.

Iniciador	Sequência	Referência
himADT - f	5'- TTGCGGAGGGTTATAAGAGC – 3'	Este estudo
himADT - r	5'- GCGTGATTTTACGGTGGGTA-3'	Este estudo
himDDT - f	5'- GTTTCGGCCTGTAATCAAGC-3'	Este estudo
himDDT - r	5'- TTTTCGGTCGAATAGCGTTT-3'	Este estudo

Caracterização das mutações por Sequenciamento de DNA

5 O sequenciamento de nucleotídeos foi feito utilizando o Kit *ET Terminator* e o Sequenciador MegaBace (GE Healthcare Life Science), seguindo-se a metodologia descrita pela Rede Nacional de Sequenciamento (BRGENE) para *Chromobacterium violaceum* (Vasconcelos *et al.*, 2003) e *Mycoplasma* sp (Vasconcelos *et al.*, 2005).

10 Para montagem dos *contigs* foi utilizado o programa ChromasPro versão 1.34 (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>). As sequências foram preparadas, alinhadas e comparadas entre si e com sequências de Typhimurium depositadas no banco de dados, para verificar a ocorrência de mutações.

15 Transdução com bacteriófago P22.

Este passo foi realizado uma vez que a seleção de recombinantes de *S. enterica* por eletroporação muitas vezes seleciona para linhagens contendo LPS incompletos que são mais facilmente transformáveis, mas são muito mais sensíveis ao sistema imune e incapazes de estabelecer uma infecção sistêmica em camundongos.

20 As linhagens STi607*himA:cat*, STi607*himD:cat*, ST662*himA:cat* e ST662*himD:cat* foram incubadas em 3 mL de meio LB com cloranfenicol (25 µg/mL) por 8 horas a 37° C, quando 1 ml de solução contendo o bacteriófago P22 (5x10⁶ pfu/mL) foi adicionado. O inoculo com P22 foi incubado durante a

25 noite à 37° C e agitação de 150 rpm.

No dia seguinte, a cultura foi centrifugada por 2 vezes a 10000g por 5 minutos e o sobrenadante recolhido. Ao sobrenadante foram adicionadas 3 gotas de cloroformio. A solução foi armazenada a 4° C.

As linhagens STi607 e ST662 foram crescidas em meio LB até que atingissem D.O.₆₀₀ igual a 0,7 e então em 100 µL dessa cultura foram adicionados 10 µL de suspensão de P22 de tal forma que a linhagem STi607 foi incubada com partículas de P22 proveniente de culturas de STi607*himA:cat* ou STi607*himD:cat* e ST662 incubada com P22 de ST662*himA:cat* ou ST662*himD:cat*. As culturas foram então incubadas por 20 minutos a 37° C, para a adsorção do bacteriófago e semeadas em LB-agar contendo cloranfenicol. Estas novas culturas foram incubadas a 37° C durante a noite.

No dia seguinte algumas colônias foram selecionadas e testadas por PCR usando os iniciadores para detecção do gene *cat* nas condições descritas anteriormente.

Exemplo 5 - Caracterização dos mutantes *himA* e *himD* de *S. enterica*

Testes Fenotípicos

Para caracterizarmos alguns fenótipos das linhagens mutantes associados à virulência bacteriana, realizamos uma bateria de ensaios *in vitro* e comparamos os fenótipos que poderiam contribuir para virulência *in vivo*.

Os mutantes derivados de *S. enterica* 4,[5],12:i:- e Typhimurium foram comparados com as respectivas linhagens selvagens, utilizadas como padrão.

5.1 - Curva de crescimento *in vitro*.

As linhagens STi607Δ*himA*, STi607Δ*himD*, ST662Δ*himA* e ST662Δ*himD* foram inoculadas em 5 mL de meio LB e incubadas à 37° C durante a noite. No dia seguinte, 1 mL do inóculo foi adicionado à 100 mL de meio LB e a nova cultura incubada à 37° C sob agitação (150 rpm), sendo retiradas alíquotas a cada hora, durante seis horas. De cada alíquota foi medida a densidade óptica em comprimento de onda 600nm (D.O.₆₀₀)

O experimento foi realizado 2 vezes e uma média desses valores calculada sendo utilizadas no preparo de gráficos para melhor visualização e análise dos resultados.

Observou-se que a linhagem STi607Δ*himA* apresenta um crescimento um pouco mais lento que STi607 porém as diferenças foram estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$). Quando observamos o crescimento de STi607Δ*himD*

em relação à selvagem, a diferença é notavelmente grande no período observado também com $P \leq 0,05$.

As linhagens ST662 Δ *himA* e ST662 Δ *himD* apresentam crescimento bastante parecido, porém mais lento quando comparados à linhagem selvagem ST662. A diferença encontrada entre o crescimento de ST662 Δ *himA* e ST662 Δ *himD* não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$), porém ambos os mutantes apresentaram significativa diferença em termos de crescimento em relação à ST662 ($P \leq 0,05$), para o intervalo de crescimento analisado

Todas as linhagens chegam à fase estacionária de crescimento

5.2 - Resistência das linhagens transformantes a Reativos Intermediários do Nitrogênio

A resistência das linhagens mutagenizadas bem como das selvagens a radicais intermediários do nitrogênio foi testada pela capacidade de crescimento destas na presença de nitrito de sódio em meio acidificado (NSA), o qual gera intermediários reativos do nitrogênio, incluindo ácido nitroso e óxido nítrico (Lu *et al.*, 1999).

Para tanto, foram adicionados 20 μ l de cultura em fase estacionária em dois tubos contendo 2ml de meio LB, pH 5,0, sendo que um deles continha nitrito de sódio 20mM (Stuehr *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1927). Os isolados foram incubados a 37°C sob agitação (200rpm). Amostras dessas culturas foram coletadas nos tempos 0, 3 e 6 horas, e diluições foram plaqueadas em meio McConkey para determinação da UFC. As colônias foram contadas no dia seguinte, e a razão de sobrevivência de *S. enterica* determinada nos diferentes tempos, comparando-se com a UFC do controle sem nitrito de sódio.

As linhagens STi mutantes e a selvagem apresentaram sensibilidade igual aos Reativos Intermediários do Nitrogênio (RNI). Após 3 horas de cultivo na presença de NSA (Nitrito de Sódio em meio Acidificado) todas as linhagens apresentaram redução próxima de 50% no número de células quando comparado ao inóculo inicial. Após 6 horas de cultivo, todas as culturas praticamente não apresentavam células viáveis.

No caso das linhagens ST, observou-se uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre ST662 Δ *himD* e as demais linhagens ST já em 3 horas de cultivo, diferença que persistiu ao longo do experimento. Diferença de menor magnitude também foi observada quando a linhagem mutante ST662 Δ *himA* foi comparada com a selvagem ST662.

5.3 - Resistência das linhagens transformantes a Reativos Intermediários do Oxigênio

A resistência à morte pelos intermediários reativos do oxigênio (ROI) está associada com o aumento da virulência em *S. enterica* Typhimurium (De Groote *et al.*, 1995; De Groote *et al.*, 1996 e Nathan *et al.*, 1991).

A resistência dos diferentes isolados a ROI foi testada pela capacidade de crescimento das amostras na presença de paraquat (N,N'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride). Esse composto é facilmente reduzido a íons reativos gerando radicais superóxidos que reagem com lipídios não-saturados da membrana.

As linhagens bacterianas foram inoculadas em 3 mL de meio LB e incubadas durante a noite a 37°C sob agitação (200rpm). Uma alíquota de 100 μ L do inóculo foi semeada em 10 mL de meio LB e a cultura incubada a 37°C sob agitação (200rpm) até atingir D.O.₆₀₀ igual a 0,7, quando foram feitas diluições seriadas até a quantidade de 10⁶ bactérias/mL, que foram inoculadas em placas de meio mínimo (Sambrook e Russell, 2001). A resistência das bactérias ao peróxido de hidrogênio foi analisada conforme descrito por De Groote *et al.* (1996). Brevemente, discos de papel de filtro foram impregnados com 30 μ L de paraquat (1,9%) e colocados no centro de placas de meio mínimo já inoculadas com as linhagens bacterianas. As culturas foram incubadas durante a noite a 37°C e os diâmetros das zonas inibitórias foram medidos em centímetros e os valores utilizados na confecção de gráficos.

A linhagem STi607 Δ *himD* apresentou maior sensibilidade ao paraquat quando comparada com STi607. Testes estatísticos demonstraram que tais diferenças são estatisticamente significantes ($P \leq 0,05$). STi607 Δ *himA* não apresentou diferença significativa em relação à linhagem selvagem quanto a

resistência ao paraquat. No caso de ST662, diferenças estatisticamente significativas foram observadas apenas entre a linhagem selvagem e o mutante *ΔhimD*.

5.4 - Determinação da Dose Letal Média (DL₅₀) por via oral em Camundongos

Para determinação da DL₅₀ por via oral, as linhagens STi607, STi607*ΔhimA*, STi607*ΔhimD*, ST662, ST662*ΔhimA* e ST662*ΔhimD* foram cultivadas em meio LB-glicose 2% a 37°C, sob agitação (200 rpm), durante a noite. No dia seguinte, 0,2mL dessas culturas foram inoculados em 20mL de meio LB-glicose e incubado a 37°C sob agitação (200rpm) até que atingissem D.O.₆₀₀ igual a 0,7. As células foram sedimentadas por centrifugação (5000g por 5 min) e lavadas no mesmo volume de tampão salina-fosfato (PBS, pH7,4). Este passo foi repetido uma segunda vez e o sedimento ressuspensionado em PBS (mesmo volume inicial). Diluições seriadas foram preparadas em PBS e usadas para infectar camundongos BALB/c fêmea de 6 a 8 semanas. As diluições foram plaqueadas em meio McConkey-ágar (Oxoid, Cambridge, UK) para a determinação da UFC. O inóculo via oral foi feito utilizando agulha de gavagem modelo IC800 (INSIGHT, Ribeirão Preto-SP, Brasil).

A quantidade de bactérias inoculadas variou de acordo com cada grupo, sendo variáveis, em escala logarítmica de base 10, de 10⁷ à 10² UFC/mL, sendo utilizados cinco camundongos por diluição. Os animais foram acompanhados por 30 dias após o inóculo.

Os valores de DL₅₀ por via oral em camundongos BALB/c, calculados pelo método “*Moving Average Interpolation*” (Welkos e O’Brien, 1994) para as linhagens de *S. enterica* mutantes e selvagens estão descritos na Tabela 5. As doses selecionadas para inóculo foram baseadas nos resultados de DL₅₀ obtidos pela via intraperitonal de inóculo, porém observa-se que os valores de DL₅₀ relacionados à administração bacteriana por via oral são superiores a DL₅₀ por via intraperitoneal (Tabela 6), resultado este já esperado. As doses letais médias por inóculo via oral para ambos os mutantes não foram atingidas

com as CFUs utilizadas no experimento, ficando superiores à 10^7 para *himA* e 10^8 para *himD*.

Tabela 5– DL₅₀ de linhagens de *S. enterica* inoculadas por via oral em camundongos BALB/c

	DL50	Referência
STi607	2.000×10^3	Este estudo
STi607 Δ <i>himA</i>	$> 1.4 \times 10^7$	Este estudo
STi607 Δ <i>himD</i>	$> 2.5 \times 10^8$	Este estudo
ST662	2.400×10^2	Este estudo
ST662 Δ <i>himA</i>	$> 2.5 \times 10^7$	Este estudo
ST662 Δ <i>himD</i>	$> 2.6 \times 10^8$	Este estudo

5.5 - Desafio via oral.

A capacidade de desencadear resposta imune contra *S. enterica* foi testada em dois momentos: No primeiro, os animais foram imunizados com uma única dose de *S. enterica* e desafiados 28 dias após a mesma, sendo as doses de imunização dos mutantes para o gene *himA* iguais a 10^6 , 10^5 e 10^4 UFC e para *himD* 10^7 , 10^6 e 10^5 UFC. Em um segundo experimento, animais foram imunizados oralmente com duas doses das linhagens mutantes nos dias 0 e 14 e desafiados com a linhagem selvagem no 28º dia após a primeira dose. A dose (CFU) utilizada foi de 10^7 para os mutantes de *himA* e 10^8 para *himD*, doses estas estabelecidas a partir dos resultados da DL₅₀. Os animais foram desafiados com doses de 10^6 CFU/mL de linhagem ST662 e 10^7 CFU/mL de STi607.

Para estes experimentos foram utilizados 7 camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas de idade por grupo. Os animais foram acompanhados por 30 dias após o desafio e avaliados quanto à sua sobrevivência

As linhagens STi607, STi607 Δ *himA*, STi607 Δ *himD*, ST662, ST662 Δ *himA* e ST662 Δ *himD* foram cultivadas como descrito anteriormente.

Observou-se que todos os camundongos imunizados com uma única dose de 10^5 ou 10^6 UFC da linhagem STi607 Δ himA sobreviveram quando desafiados com doses letais (10^7 CFU/mL) da linhagem selvagem STi607, 30 dias após a imunização. Quando imunizados com 10^4 UFC de STi607 Δ himA, 66% dos animais sobreviveram ao desafio.

Os resultados obtidos com a linhagem STi607 Δ himD indicaram sobrevivência de 100% dos camundongos imunizados com 10^7 UFC, enquanto os grupos imunizados com 10^6 e 10^5 UFC apresentaram 33% de sobrevivência, após 30 dias.

Os grupos imunizados com a linhagem ST662 Δ himA, nas doses 10^6 e 10^5 CFU, apresentaram sobrevivência de 66% dos animais. Na dose de 10^4 CFU, a porcentagem de 33% dos animais sobreviveu, após 30 dias.

Nas imunizações com ST662 Δ himD, apenas os animais que receberam doses de 10^7 CFU sobreviveram ao desafio com linhagem selvagem, à uma taxa de 66%, após 30 dias de experimento. Os demais grupos, apesar de terem o tempo de vida prolongado, morreram após 20 dias do desafio. Todos os grupos os animais tratados com placebo, inoculados com PBS, morreram entre o 5º e o 10º dia após serem desafiados com as linhagens selvagens.

5.6 - Determinação da Dose Letal Média (DL₅₀) intraperitonal em camundongos

Para determinação da DL₅₀ intraperitonal, as amostras STi607, STi607 Δ himA, STi607 Δ himD, ST662, ST662 Δ himA e ST662 Δ himD foram cultivadas em meio LB-glicose 2% a 37°C, sob agitação (200 rpm), durante a noite. No dia seguinte, 0,2mL dessas culturas foram inoculados em 20mL de meio LB-glicose e incubado a 37°C sob agitação (200rpm) até que atingissem D.O.₆₀₀ igual a 0,7. As células foram sedimentadas por centrifugação (5000g por 5 min) e lavadas no mesmo volume de tampão salina-fosfato (PBS, pH7,4). Este passo foi repetido uma segunda vez e o sedimento ressuspense em PBS (mesmo volume inicial). Diluições seriadas foram preparadas em PBS e usadas para infectar camundongos BALB/c fêmea de 6 a 8 semanas. As diluições foram plaqueadas em meio McConkey-ágar (Oxoid, Cambridge, UK) para a

determinação da UFC. Os camundongos foram infectados via intraperitoneal com 0,1ml das suspensões bacterianas com seringas de 1 mL e agulhas apropriadas 0,45mm. Foram inoculadas doses que variaram, em escala logarítmica de base 10, de 10^9 à 10^2 UFC/mL, sendo utilizados três camundongos por diluição. Os animais foram acompanhados por 30 dias após o inóculo.

Os valores de (DL_{50}), em camundongos inoculados pela via intraperitoneal, calculados pelo método "*Moving Average Interpolation*" (Welkos e O'Brien, 1994) são demonstrados na Tabela 6. Observa-se que a DL_{50} das amostras selvagens ficaram em torno de 10^3 UFC enquanto das linhagens mutantes para o gene *himA* em torno de 10^5 e para os mutantes *himD* em torno de 10^6 .

Tabela 6 – DL_{50} em camundongos BALB/c inoculados pela via intraperitoneal.

	DL50	Referência
STi607	3.134×10^3	Este estudo
STi607 Δ himA	2.688×10^5	Este estudo
STi607 Δ himD	8.854×10^6	Este estudo
ST662	2.000×10^3	Este estudo
ST662 Δ himA	1.703×10^5	Este estudo

5.7 - Desafio via inoculação intraperitoneal

Igualmente aos estudos realizados por desafio via oral, foram conduzidos experimentos para verificar se camundongos inoculados com doses não letais das linhagens mutantes adquiriam resistência quando desafiados com doses letais da linhagem selvagem por via intraperitoneal. Para isso, as linhagens foram cultivadas e processadas conforme descrito anteriormente. Diluições seriadas foram preparadas em PBS e usadas para infectar camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas, conforme descrito anteriormente. Foram injetadas por via intraperitoneal duas doses de 10^2 , 10^3 ou 10^4 UFC de cada mutante *himA* e 10^4 , 10^5 ou 10^6 dos mutantes *himD*, com

intervalo de 15 dias entre cada dose. Como controle, animais foram injetados com PBS. Dez dias após a segunda dose, os animais foram desafiados com 10^4 UFC das linhagens selvagens STi607 e ST662, e a sobrevivência foi acompanhada ao longo de 30 dias de experimento. Foram utilizados três

5 animais por tratamento.

Observou-se que 100% dos animais imunizados com doses inferiores à DL_{50} (10^3 e 10^4 células bacterianas) da linhagem STi607 Δ *himA*, sobreviveram ao desafio com dose letal ($3 \cdot 10^5$ CFU/mL) da linhagem selvagem STi607. Os animais imunizados com a dose de cerca 10^2 células da linhagem mutante e o

10 controle (animais inoculados com tampão PBS), morreram aproximadamente após 10 dias de desafiados.

A linhagem STi607 Δ *himD* não foi capaz de desencadear uma resposta imune efetiva com as doses ministradas neste experimento. Observou-se que 33% dos animais imunizados com as doses mais elevadas ($1 \cdot 10^4$ CFU/mL)

15 sobreviveram ao desafio. Os demais animais morreram no 10º dia do desafio em diante.

Com relação à linhagem ST662, todos os camundongos BALB/c imunizados com as duas doses imediatamente inferiores à DL_{50} ($2,5 \cdot 10^4$ e $2,5 \cdot 10^3$ CFU/mL) do mutante ST662 Δ *himA* sobreviveram ao desafio com dose

20 letal ($2 \cdot 10^5$ CFU/mL) da linhagem selvagem. Grupos imunizados com doses mais baixas desse mutante apresentaram aproximadamente 33% de sobrevivência, enquanto o grupo tratado com placebo não apresentou sobreviventes.

Foi possível observar camundongos sobreviventes imunizados com a

25 linhagem ST662 Δ *himD*. Após o desafio, todos os animais imunizados previamente com doses imediatamente inferiores DL_{50} ($1 \cdot 10^5$ CFU/mL) sobreviveram, enquanto os imunizados com doses de 10^4 apresentaram uma taxa de sobreviventes de 33%. Os grupos com doses de 10^3 e PBS não apresentaram sobreviventes.

30 Testes Genotípicos

5.8 - Seqüenciamento de DNA e montagem de contigs.

As linhagens selvagens ST662 e STi607, assim como as linhagens mutantes foram submetidas ao seqüenciamento das regiões *himA* e *himD* no intuito de melhor caracterizar a mutação destes genes. O resultado do seqüenciamento está demonstrado para STi607 e STi607 Δ *himA* (Figuras 4 e 5 respectivamente). Para melhor visualização, foram destacadas em cores as regiões preservadas e removidas de *himA*. Na Figura 5 foram destacadas as localizações dos iniciadores utilizados para gerar o cassete de recobinação. As diferenças entre algumas bases das seqüências obtidas e as depositadas em bancos de dados foram devido a erros de leitura durante o seqüenciamento.

Além da caracterização molecular das deleções em *himA* ou *himD*, as linhagens mutantes de *S. enterica* foram caracterizadas quanto a presença de alguns fatores de virulência, para descartar a ocorrência de recombinações e/ou deleções em genes importantes patogenicidade.

5.9 - Detecção da presença de genes de virulência em *S. enterica*

A detecção de alguns genes de virulência de *S. enterica* cuja PCR já está bem estabelecida na literatura foi realizada por esta técnica. A presença dos seguintes genes de virulência foi pesquisada: de invasão (*invE/A*) e de multiplicação *in vivo* (*spvC*), este último presente no plasmídio de virulência. Os iniciadores estão descritos na Tabela 5. Foram testadas as linhagens STi607, STi607 Δ *himA*, STi607 Δ *himD*, ST662, ST662 Δ *himA* e ST662 Δ *himD*.

Tabela 5 – Iniciadores utilizados na detecção de alguns genes responsáveis pela patogenicidade de *S. enterica*.

Iniciador	Sequência	Referência
invE/AF	5'-TGCCTACAAGCATGAAAT GG-3'	Stone et al., 1994
invE/AR	5'-AAACTGGACCACGGTGA AA-3'	Stone et al., 1994
SpvCF	5'-ACTCCTTGCACAACCAAATGCGGA-3'	Guerra et al., 2000
SpvCR	5'-TGTCTTCTGCATTTCGCCACCATCA-3'	Guerra et al., 2000

Ambos os genes, de invasão (*invE/A*) e de multiplicação *in vivo* (*spvC*), foram identificados tanto nas linhagens selvagens quanto nas linhagens

mutantes indicando que após a mutagênese as linhagens não perderam os mesmos.

Reivindicações

Vacinas Compreendendo Linhagens Atenuadas, Processo de Construção de Linhagens Atenuadas, Vetores Vacinais e seu Uso no Tratamento da Salmonelose

5

1. Vacina caracterizada por compreender uma linhagem atenuada de uma bactéria patogênica, onde a atenuação corresponde ao silenciamento de pelo menos um gene codificador de IHF.

10 2. Vacina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela bactéria patogênica ser escolhida do grupo que compreende *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Francisellaceae*, *Legionellales*, *Pseudomonadaceae*, *Pasteurellaceae* e combinações dos mesmos.

15 3. Vacina, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pela bactéria patogênica ser escolhida dentre *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia* spp., *Yersinia* spp., *Vibrio* spp e combinações das mesmas.

4. Vacina, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pela bactéria patogênica ser *S. enterica*, sorovar Typhimurium (ST662) e/ou variante I 4,[5],12:i-. (STi607).

20 5. Vacina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo gene codificador de IHF ser uma sequência genômica que apresente homologia de pelo menos 80% com pelo menos uma sequência escolhida dentre *himA* ou *himD*.

6. Processo de construção de linhagem atenuada caracterizado por compreender as etapas de:

- 25 a) recombinação da bactéria patogênica com um bacteriófago que iniba o sistema ExoV do hospedeiro e promova a recombinação de fragmentos lineares no DNA alvo;
- b) troca alélica do gene codificador de IHF pelo cassete de recombinação compreendendo um gene acessório; e
- 30 c) eliminação do gene acessório presente no cassete de recombinação.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo bacteriófago ser capaz de expressar os genes γ , β e *exo*.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo cassete de recombinação compreender um iniciador.

5 9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo iniciador ser composto de uma primeira sequência homóloga ao gene codificador de IHF e uma segunda sequência homóloga a uma região presente no bacteriófago.

10 10. Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pela primeira sequência compreender aproximadamente 40 bases.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pela segunda sequência compreender aproximadamente 20 bases.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo gene acessório ser um gene que confere resistência a antibióticos.

15 13. Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pela eliminação do gene acessório ser realizada por uma enzima.

14. Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pela enzima ser uma recombinase.

20 15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pela recombinase ser expressa por um gene plasmidial.

16. Vetores vacinais caracterizados por possuir pelo menos um gene codificador de IHF silenciado e ser capaz de estimular uma resposta imune contra uma infecção por uma bactéria patogênica.

25 17. Vetores vacinais, de acordo com a reivindicação 16, caracterizados pela resposta imune ser humoral e/ou celular.

18. Vetor vacinal, de acordo com a reivindicação 4, caracterizados por carrear antígenos, constituído-se linhagens vacinais multifatoriais.

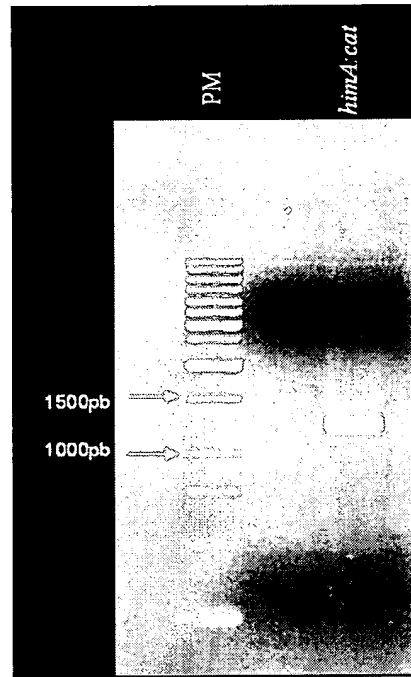


FIGURA 1

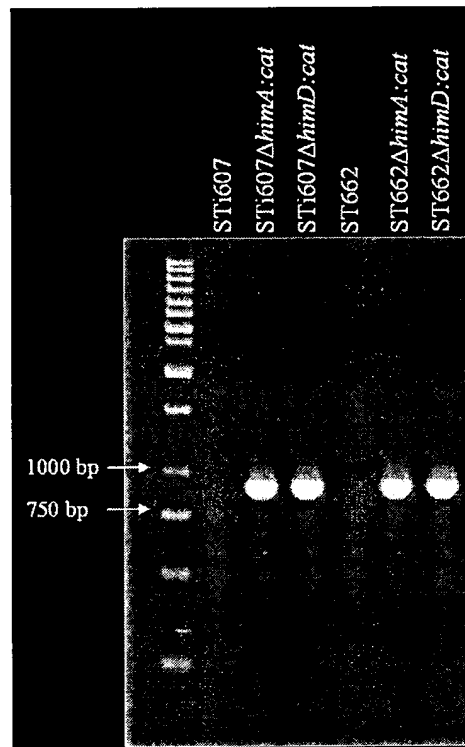


FIGURA 2

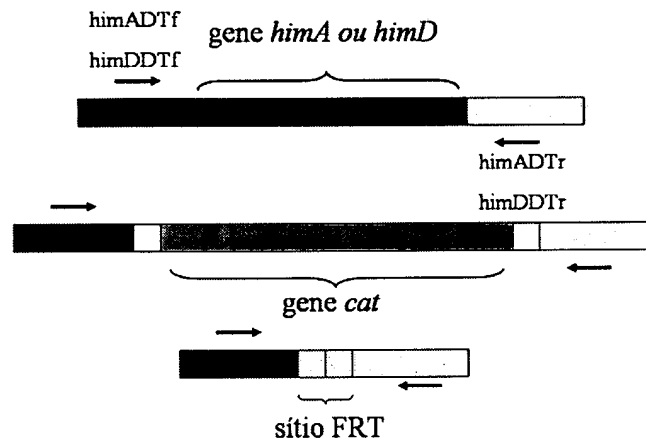


FIGURA 3

```
>STi607SF well B03 Run01 Cimarron 3.12 450
CAAGAGCAAGGATTAGAGAGAAGAGAGATGCCGACGNGCGCTAAAAATGTGT
AGCGGCATTAAAAGAGCGATTCCAGGCATCATGAGGGATTGAACCTATG
GCGCTTACAAAAGCTGAAATGTCAGAAATATCTCGTTTGATAAGCTTGGCT
TAAGCAAGCGGGGATGGCAAAGAACCTGGTTGAACTGTTTTTCGAAGAGAT
CCGTCTGTGCTCTGGAAAAACGGTGAGCAGGTGAAATCCTACTGGTTTTGGT
AACTTCGATCTGCGTATAAAATCAAACGTCCGGGGCGTAACCCGAACAAACG
GTTGAAGATATACCTATTACAGCACGGAGCCGTGGTGACCATTCAGACCC
GGGACAGAAGTTACAAAGAGCCGGGTGCGAAACGCTTCGCACAAAAAGAAGA
GTAATCAGATCCAGGCATAAACATCCATCAGGGTGTTNATTCGGGCAGAA
TACGCTGCCAATCCCCGAAAGTTGATCAGCGGGATGACAGCTTAATATTA
TCAGCCCTGAAAAATGACCCGTATAACT
```

FIGURA 4

```
>STi607ΔhimAF well D03 Run01 Cimarron 3.12 264
ACAGACCCACCGNNNTANAGAAAAGAGGAGCATTGCCGCCNACGTTCGTTA
AATGTGTAGAGGCATTAAAAGAGCGATTCCAGGCATCATGAGGGATTCCG
AACCTATGGCGCTTACAAAAGCTGAAATGTCAGAAATATCTGTTGTGATA
CGCATAGGCAAGTAAAGCGGCAATATTCATATGTAATCAGATCCAGGC
ATAACATCCATCAGGGTGTAATTCGGGCAGATACGCTGCNTATCCCCGAAAG
TAGATCAGCGGGATGACAGCGTATTTGTCAGCCTGAAAAATGACCCGTATA
ACTAAAAAGGCCGCACTTGGTNCTTTCAA
```

FIGURA 5

Resumo

Vacinas Compreendendo Linhagens Atenuadas, Processo de Construção de Linhagens Atenuadas, Vetores Vacinais e seu Uso no Tratamento da Salmonelose

5

A presente invenção revela uma nova alternativa para a prevenção de salmonelose, a partir de mutantes capazes de promover imunização do hospedeiro. Em especial tais mutantes são nulos para os genes *himA* e *himD* de IHF e foram testados quanto a atenuação da virulência e capacidade de desencadear resposta imune efetiva e protetora contra a salmonelose, em especial a salmonelose murina.

10

Logo, a presente invenção está destinada a um processo de produção desta linhagem de mutantes atenuados, capazes de promover imunização, a vetores vacinais e vacinas para o tratamento de salmonelose e a seu uso no combate a tal infecção.

15