



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**CLONAGEM E EXPRESSÃO EM *Mycobacterium bovis* BCG CONTENDO A REGIÃO R1
DA ADESINA P97 DE *Mycoplasma hyopneumonae***

VALESKA LIZZI LAGRANHA

MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO



Universidade Federal de Pelotas
Campus Universitário s/nº
Caixa-postal 354 CEP 96010-900
Pelotas – RS – Brasil

2005

VALESKA LIZZI LAGRANHA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO EM *Mycobacterium bovis* BCG CONTENDO A
REGIÃO R1 DA ADESINA P97 DE *Mycoplasma hyopneumoniae***

**Monografia apresentada ao curso
de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pelotas
como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas, na área
de Biotecnologia, sob orientação
do Prof. Dr. Odir A. Dellagostin.**

PELOTAS

Rio Grande do Sul – Brasil

2005

VALESKA LIZZI LAGRANHA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO EM *Mycobacterium bovis* BCG CONTENDO A
REGIÃO R1 DA ADESINA P97 DE *Mycoplasma hyopneumoniae***

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, na área de Biotecnologia, sob orientação do Prof. Dr. Odir A. Dellagostin.

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: Odir Antônio Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr.: Fabio Leivas Leite, Universidade Federal de Pelotas.

Dr.: Fabricio Rochedo Conceição, Universidade Federal de Pelotas.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Loiri, pelo carinho, incentivo, compreensão. E, que dividiu comigo a ansiedade pela distância e saudade... Mas que mesmo distante se fez presente.

Aos meus irmãos, Michela e Thiago, ao meu sobrinho Diego, que sempre me incentivaram e também pelo seu pelo carinho e compreensão.

Aos meus tios Milton e Carmem que me ajudaram nas horas difíceis e aos primos Liliane e Batista, pela acolhida na recém chegada em Pelotas.

Al mio carissimo João Luiz per il relativo affetto, amicizia e per la sua pazienza a prestare il computer a me! Grazie per tutto!

Ao Prof. Dr. Odir Dellagostin pela valiosa orientação, constante apoio, confiança e principalmente pela amizade.

Ao Dr. Fabrício Rochedo Conceição pela especial co-orientação, pelos ensinamentos e paciência.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular em especial a Sibebe, Fabrício, Fabiana, Gustavo, Suselaine, Marcelo, Tessália, Francine, Michel, Michele, Simone, Vanuza, Robson, Sandra e Daiane, pela amizade e auxílio na realização deste trabalho. Um agradecimento especial a André Michelin, pela orientação inicial na minha

Aos colegas, amigos e estagiários do Centro de Biotecnologia da UFPel pela amizade, ensinamento e auxílio em diversas etapas

Aos colegas e amigos do curso de Ciências Biológicas pela amizade e convívio durante o curso.

Aos professores, pela amizade e pelos ensinamentos transmitidos que colaboraram para minha formação.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

INDICE

RESUMO	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Pneumonia Enzoótica Suína	1
1.1.1. Agente Etiológico	2
1.1.2. Imunologia Pulmonar.....	3
1.1.3. Impacto Econômico.....	4
1.1.4. Vacinas	4
1.2. Vacinas Recombinantes	6
1.3. Micobacterias	7
1.3.1. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	8
1.3.2. BCG Recombinante.....	9
1.4. Subunidade B da toxina Termolábil de <i>E. coli</i>.....	13
1.5. Objetivos	14
1.5.1. Objetivo Geral	14
1.5.2. Objetivos Específicos.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1. Material	15
2.1.1. Cepas bacterianas	15
2.1.2. Plasmídeos	15
2.1.3. “Primers”.....	15
2.1.4. Enzimas	16
2.1.5. Kits utilizados	16
2.1.6. Meios de Cultura.....	16
2.1.7. Soluções Utilizadas	18
2.2. Métodos	21
2.2.1. Obtenção e preparo das seqüências gênicas <i>r1</i> e <i>ltb-r1</i>	21
2.2.2. Preparo dos vetores	23
2.2.3. Reação de Ligação.....	24
2.2.4. Transformação de <i>E. coli</i> TOP10.....	24
2.2.5. Transformação de <i>M. bovis</i> BCG Pasteur	26
2.2.6. Análise por “Western Blot”	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.1. Resultados	30
3.1.1. Obtenção e preparo das seqüências gênicas <i>r1</i> e <i>ltb-r1</i>	30
3.1.2. Preparo dos vetores	31
3.1.3. Construção dos vetores de expressão.....	31
3.1.4. Expressão das proteínas recombinantes	34
3.2. Discussão	35

4. CONCLUSÃO.....	38
5. PERPECTIVAS FUTURAS	39
6. REFERÊNCIAS	40

RESUMO

LAGRANHA, VALESKA LIZZI. Universidade Federal de Pelotas, julho de 2005. Clonagem e expressão em *Mycobacterium bovis* BCG contendo a região R1 da adesina P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Professor Orientador: Odir Antônio Dellagostin.

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína (PES), a mais importante doença respiratória de suínos. Este patógeno coloniza os cílios do epitélio respiratório, paralisando e posteriormente destruindo-os, predispondo o animal a infecções secundárias. A região R1 da adesina P97 é responsável por essa aderência. Esta região é altamente imunogênica e constituída por uma seqüência repetitiva de cinco aminoácidos (AAKPV-E). O objetivo deste trabalho foi de expressar em *Mycobacterium bovis* BCG a região R1 do gene *p97*, bem como a fusão desta região com a subunidade B da toxina *Escherichia coli* (LTB-R1), um potente adjuvante de mucosa. A região R1 e o híbrido LTB-R1 foram amplificados por PCR. Após a amplificação os insertos e os vetores foram digeridos com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III, ligados com T4 DNA ligase e transformado primeiramente em *E. coli* TOP10 e posteriormente em *M. Bovis* BCG. Os vetores de expressão utilizados foram: pUS977 (promotor P_{AN} isolado de *M. paratuberculosis*), pUS2000 (promotor da proteína 18kDa) e pAU5 (promotor da proteína de choque térmico *hsp60* com uma mutação), todos de expressão citoplasmática. BCGs recombinantes foram cultivados em meio 7H9, suplementados com OADC por 10 dias até atingir DO_{600nm}=1.8, após foram centrifugados, lisados e a expressão dos antígenos foi avaliada blot com MAb anti-R1. Os BCGs recombinantes que continham a região R1 tiveram sua expressão confirmada, sendo que os níveis de expressão *in vitro* foram semelhantes para todos os vetores e a proteína expressa apresentou quatro bandas entre 14 e 19 kDa . A LTB-R1 formou pentâmeros e apresentou bandas de 30 kDa, sendo que o tamanho esperado era de 25 kDa. Interessantemente o mesmo resultado foi obtido na expressão desta proteína em *E. coli*; acreditamos estar ocorrendo alguma alteração pós traducional, que já está sendo investigada. Estes resultados encorajam um estudo da viabilidade da expressão *in vivo* destas proteínas e sua capacidade de induzir resposta imune em camundongos.

LISTA DE ABREVIATURAS

μ g: micrograma
 μ l: microlitro
 μ m: micrômetro
 μ M: micromolar
CIP: “calf intestinal phosphatase”
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA: ácido etileno diamino tetracético
h: hora
Kan: “kanamycin”
kb: quilo bases
kDa: quilo Dalton
LB: caldo de Luria Bertani
M: concentração molar
MAb: “Monoclonal antibody”
mg: miligrama
min: minuto
ml: mililitro
mM: concentração milimolar
ng: nanograma
pb: pares de bases
PCR: “polimerase chain reaction”
pH: potencial hidrogeniônico
rpm: rotações por minuto
s: segundos
SDS: dodecil sulfato de sódio
TBE: tampão tris-borato-EDTA
TE: tampão tris-EDTA
TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina
UV: luz ultra violeta

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pneumonia Enzoótica Suína

A pneumonia micoplásmica ou pneumonia enzoótica suína (PES) é uma respiratória infecciosa crônica e muito contagiosa, sendo causada pela *Mycoplasma hyopneumoniae*. É caracterizada por uma broncopneumonia catarral que se manifesta por tosse seca e cerca de quatro semanas após a infecção, alta morbidade (atingindo mais de 90% dos animais), baixa mortalidade (de 1% a 5% dos animais) e geralmente é acompanhada por complicações broncopulmonares purulentas (Straw, *et al.*, 1989).

Quando há presença de fatores de risco, a doença evolui para um processo mais complexo, predispondo os animais às infecções secundárias por bactérias ou prejudica a capacidade de defesa antibacteriana pulmonar. O animal fica vulnerável a pneumonias por outros agentes que podem estar na granja. Os mais comuns desses agentes são: *Pasteurella multocida* tipo A, *Haemophilus influenza*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Bordetella bronchiseptica*, entre outros. Denominadas de “Complexo de Doenças Respiratórias em Suínos” (CDRS), essas pneumonias secundárias aumentam a taxa de mortalidade dos animais e desencadeiam perdas econômicas significativas (http://www.pfizer-ahg.com.br/sui_Estudos1.asp).

A PES afeta suínos de todas as idades, porém a forma clínica da doença é mais comum nos animais em crescimento e terminação. A transmissão ocorre por contato direto, indireto (através de utensílios), através de aerossóis eliminados durante os acessos de tosse que podem ser transmitidos para criações a até 3,2 km de distância. Variáveis ambientais e de manejo favorecem a sua ocorrência e severidade, por isso é considerada uma doença multifatorial (http://www.pfizer-ahg.com.br/sui_Estudos1.asp).

Os principais fatores de risco que podem desencadear a pneumonia enzoótica e que devem ser monitorados são: densidade excessiva, mais do que 15 animais por baia e área menor que 0,85 m²/ suíno (superlotação); ausência de vazio

sanitário entre lotes; ausência de controle de ventilação e temperatura na sala; amplitude térmica diária superior a 8°C no primeiro mês de alojamento; volume de ar disponível menor que 3,0 m³/suíno; sistema de produção em ciclo completo; presença de gases e poeira na sala; sub populações nas diferentes fases da criação sem imunidade; misturas de animais de diferentes tamanhos, idades e origens; disponibilidade de comedouros insuficientes ao número de animais; níveis inadequados de minerais na ração (fósforo, cobre, zinco, ferro e manganês); presença de micotoxinas (aflatoxina) nas rações; programa de limpeza e desinfecção deficiente e plantel com mais de 40% de matrizes entre marrãs, primíparas e segundo parto.

1.1.1. Agente Etiológico

Micoplasmas são organismos procarióticos que não possuem parede celular, pertencente à classe *Mollicutes*. Possuem um genoma pequeno (580 a 2.200 kb) e conteúdo baixo de guanina e citosina (G + C) (Shmuel *et al.*, 1998). São os menores organismos autoreplicantes conhecidos. Possuem uma alta sensibilidade aos detergentes e às alterações osmóticas, são naturalmente resistentes à penicilina e, formam colônias com aspecto que lembra um "ovo-frito".

O primeiro micoplasma foi descoberto há mais de cem anos, em 1898 na França, por Edward Nocard e Emile Roux, então trabalhando em um caso de pleuropneumonia bovina. Em 1905, um provável quadro de infecção conjugada de *Mycoplasma gallisepticum* e *Pasteurella multocida* foi diagnosticado como "Pneumonia Enzoótica dos Perus", confirmando as aves também como hospedeiros de micoplasmas (Shmuel, *et al.*, 1998).

Desde seu primeiro isolamento de lesões pulmonares (Mare & Switzer, 1965 e Goodwin *et al.*, 1965), o *M. hyopneumoniae*, tem sido descrito em diversos países como um dos agentes mais comuns envolvidos em problemas respiratórios dos suínos, causando importantes perdas econômicas (Shmuel, *et al.*, 1998).

O *M. hyopneumoniae* coloniza o trato respiratório dos suínos. Durante a infecção este agente adere-se aos cílios do epitélio respiratório, provocando as estruturas, o que pode levar a infecções secundárias (Zhang, *et al.*, 1994).

tos T, macrófagos ativados, etc). Assim como o sistema -específico é de fundamental importância para o início da resposta imune, a imunidade celular desempenha um papel fundamental na proteção pulmonar contra os efeitos do *M. Hyopneumoniae* (Messier & Ross, 1991).

Dois fatores da patogenia do *M. hyopneumoniae* desempenham um importante papel na predisposição aos agentes secundários. A colonização do epitélio ciliar do trato respiratório pelo *M. hyopneumoniae* acarreta a destruição do mesmo, fazendo com que uma das barreiras mecânicas da imunidade não-específica seja perdida, com conseqüente redução da capacidade de defesa do trato (Chen *et al.*, 2001).

. Outro evento potencialmente importante é a interação do *M. hyopneumoniae* com células linfóides, fazendo com que os animais infectados tenham a atividade fagocítica dos macrófagos alterada, levando a um processo de imunossupressão

ão no ambiente. A vacinação também promove a redução dos sinais clínicos da doença e mantém os animais saudáveis livres de patologias.

et al. 1997). Os anticorpos monoclonais (MAbs) F1B6 e F2G5 reconheceram a P97 em “imunoblotting” e bloquearam a aderência do *M. hyopneumoniae* a células ciliadas “in vitro”, indicando que a P97 possui papel fundamental na patogenia da PES, tornando-a uma forte candidata a antígeno vacinal.

ção da tuberculose, pode ser usada como vetor para a expressão de antígenos heterólogos e proteínas bioativas. O BCG recombinante induz uma imunidade humoral e celular de longa duração e tem todas as

-Neelsen, na qual as células são coradas com carbofucsina,

descoloradas com álcool ácido e coradas novamente com azul de metileno e então as células micobacterianas aparecem coradas de vermelho.

Muitas das propriedades da micobactéria, tais como sua antigenicidade, propriedades adjuvantes, virulência e atividade anti-tumorais, são atribuídas aos componentes da sua parede celular. Os arabinogalactanos são os maiores componentes antigênicos da parede celular, o complexo arabinogalactano-peptidoglicano é responsável pelas propriedades antitumor e adjuvantes (McFadden, 1992).

1.3.1. *Mycobacterium bovis* BCG

A vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) foi desenvolvida no Instituto Pasteur em Lille, França, a partir de 1908, quando Albert Calmette e Camille Guérin obtiveram uma cepa de *Mycobacterium bovis* isolada por Nocard em 1902 de uma mastite bovina. Após 231 subcultivos de 3 semanas cada, em meio de cultura contendo bile bovina, o microrganismo perdeu sua virulência em animais. Até 1921, testes foram realizados e demonstraram que a infecção de bovinos, camundongos, macacos rhesus e chimpanzés com esta cepa não produziram evidência de virulência, mas que por outro lado conferiu resistência ao desafio com o bacilo da tuberculose bovina ou humana. O BCG havia se tornado apatogênico, ou seja, não era mais capaz de causar tuberculose, mas manteve suas características sua viabilidade e um nível apropriado de virulência residual permitindo sua manipulação no indivíduo vacinado com o objetivo de imunizar contra subseqüentes infecções virulentas (Lugosi, 1992). Muitas outras cepas foram subseqüentemente derivadas do isolado original, (mais de 50 sub-cepas), as quais são comumente identificadas pelo país ou laboratório de produção e somente seis são atualmente utilizadas como vacinas: BCG Connaught, BCG Glaxo, BCG Moreau, BCG Pasteur, BCG Danish e BCG Tokyo (Minnikin *et al.*, 1984; Miltien & Gibson, 1989; Langranderie *et al.*, 1996).

A primeira vacinação humana, via oral, com BCG para a prevenção da tuberculose, foi realizada em 1921, em Paris. Em 1928, o BCG foi recomendado pela Liga das Nações e passou a ser largamente utilizado para a prevenção da tuberculose, mas em 1929-30 sua segurança foi questionada para a prevenção da tuberculose quando 72 crianças de um total de 250 morreram após receber a vacina BCG preparada em um Instituto em Lübeck na Alemanha. Subseqüentes

investigações revelaram que o incidente não foi devido a reversão da virulência do BCG, mas foi consequência de uma contaminação acidental do BCG vacinal com uma cepa virulenta de *M. tuberculosis* (Lugosi, 1992). Em 1931 a Academia de Medicina de Paris reforça a recomendação da Liga das Nações, confirmando a segurança do BCG para uso em humanos e animais e, apesar dos protestos que se seguiram após o incidente em Lübeck, a vacinação com BCG prosseguiu. Após a Segunda Guerra Mundial, devido a grande epidemia de tuberculose, a Organização Mundial da Saúde e a UNICEF organizaram campanhas de vacinação com BCG em diversos países e o número de indivíduos vacinados de 1948 a 1974 foi estimado em 1,5 bilhões (Lugosi, 1992). Atualmente, o BCG é uma das vacinas mais amplamente utilizada, já tendo sido administrada a aproximadamente 3 bilhões de pessoas desde 1948, apresentando uma baixa incidência de efeitos colaterais (Bloom & Fine, 1994).

O BCG apresenta excelentes propriedades adjuvantes e imunoestimulantes. O Adjuvante Completo de Freund (CFA), uma suspensão de restos celulares de *M. tuberculosis* em uma emulsão de água e óleo, é responsável pela potencialização da resposta imunológica do hospedeiro contra antígenos não relacionados incluídos na de imunidade celular e humoral dirigidos contra o antígeno exógeno são obtidos e mantidos por longos períodos (Bloom & Fine, 1994).

1.3.2. BCG Recombinante

O BCG tem demonstrado ser um excelente candidato pra a utilização como vetor para uma vacina recombinante, pois tem a vantagem de já ser administrada rotineiramente como vacina contra a tuberculose, o que pode tornar mais fácil sua

Dentre suas vantagens destaca-se: (1) é uma das vacinas mais largamente utilizadas no mundo; (2) pode ser administrada em qualquer época após o nascimento, não sendo afetada pelos anticorpos maternos; (3) tem um potente efeito imunoestimulante e adjuvante, induzindo uma longa imunidade e sendo capaz de estimular tanto resposta imune humoral e celular; (4) BCG é administrada em uma única dose; (5) pode ser administrada por via oral; (6) é uma das vacinas replicantes mais estáveis não necessitando de um método de armazenagem sofisticado para manter sua eficácia; e (7) apresenta baixo custo de produção (Bloom & Fine, 1994).

(Snapper *et al.*, 1988) ou plasmídeos integrativos (Husson *et al.*, 1990).

Os plasmídeos extra-cromossomais têm a vantagem de estarem presentes em um alto número de cópias (Stover *et al.*, 1991), podendo então, apresentar uma maior expressão da proteína recombinante, e de não provocarem nenhuma alteração no genoma do BCG. Estes plasmídeos foram sendo desenvolvidos utilizando o replicon (plasmídeo) micobacteriano pAL5000, isolado de *M. fortuitum* (Labidi *et al.*, 1985) associado a um vetor de clonagem em *E. coli* e possuindo um gene de resistência a canamicina (Snapper *et al.*, 1988). Assim foram construídos os

vetores pMV261 (Stover *et al.* 1991), pRR3 (Winter *et al.*, 1991) e pEP3 (Radford & Hodgson, 1991).

A utilização de seqüências específicas de micobactérias pode levar a integração do vetor no genoma micobacteriano. Um sistema integrativo utilizado em micobactéria é derivado do micobacteriófago L5. O vetor possui um sitio de *attP* e um gene da integrase (*int*) que promove, a integração deste no genoma micobacteriano ao sítio *attB*. No entanto, este sistema pode levar a integração de uma única cópia ao genoma (Lee *et al.* 1991). Vetores integrativos baseados no elemento de inserção IS 900 promovem uma integração aleatória ao genoma bacteriano, apresentando o potencial de estar em várias cepas (Dellagostin *et al.*, 1993).

1.3.2.2. Promotores micobacterianos e expressão de genes heterólogos

Os promotores micobacterianos regem o nível de expressão dos antígenos. Os promotores mais utilizados são os do gene *hsp60* e *hsp70*, ambos pertencem a família das proteínas do choque térmico (Aldovani & Young, 1991; Stover *et al.*, 1991). Outros promotores têm sido utilizados, como o promotor pAN, isolado de *M. paratuberculosis* próximo a um elemento de inserção IS 900 (Murray *et al.*, 1992), o promotor da proteína de 19 kDa de *M. tuberculosis* (Stover *et al.*, 1993) e o promotor 18 kDa de *M. leprae* (Dellagostin *et al.*, 1995), o promotor á (alfa) de *M. kansasii* (Matsuo *et al.*, 1990), o promotor da lactamase de *M. fortuitum* pBlaF* (Timm *et al.*, 1994), bem como o promotor GroES/EL1 de *Streptomyces albus* (Winter *et al.*, 1991).

Antígenos de vírus, bactérias, parasitas e até citocinas têm sido expressas sob controle dos promotores *hsp60* e *hsp70*. A subunidade B da toxina colérica foi expressa em BCG sob o controle do promotor *hsp60* e a imunização intranasal com BCG recombinante desenvolveu uma forte resposta de IgA (Biet *et al.*, 2003). A proteína LacZ e os antígenos gp120 do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), gag do vírus da imunodeficiência símia (SIV) e fragmento C da toxina tetânica foram expressos sob o controle dos promotores *hsp60* e *hsp70* em vetores integrativos e replicativos (Aldovini & Young, 1991; Stover *et al.*, 1991).

Winter *et al.* (1995) expressaram a proteína nef de SIV utilizando o promotor pAN e BCG expressando esta proteína induziu resposta de células T citotóxicas (CTL) contra o peptídeo sintético nef em camundongos. O gene gp63 de *Leishmania*

major foi expresso em BCG sob o controle também do promotor pAN, e fusionado na -terminal à β -lactamase. BCG recombinante (rBCG) produzindo Gp63 como proteína híbrida com a β -lactamase promoveu proteção significativa contra desafio com *L. major* em camundongos BALB/c imunizados (Abdeclhak *et al.*, 1995).

Matsuo *et al.* (1990) introduziram um epitopo da proteína Gag p17 do vírus HIV-1 em um sítio adjacente ao antígeno α , resultando na expressão da proteína secretada, mas uma resposta imune não foi obtida. O epitopo V3 do vírus HIV-1 quando expresso fusionado ao antígeno α foi secretado por BCG induzindo uma resposta protetora em camundongos (Kameoka *et al.*, 1994).

A subunidade S1 da toxina de *Bordetella pertussis* (S1PT) foi expressa sob controle do promotor da β -lactamase pBlaF* (Nascimento *et al.*, 2000). O fragmento C da toxina tetânica (FC) e a toxina diftérica mutada atóxica (CRM197) reguladas pelo promotor pBlaF* ou fusionadas a seqüência sinal foram expressas em BCG. Imunização de camundongos com rBCG-FC ou a combinação induziu proteção de 75% em camundongos desafiados (Mazzantini *et al.*, 2004). Os genes *nef* e *gag* (p26) de SIV foram expressos em BCG reguladas também sob o promotor pBlaF* em vetores integrativos e replicativos (Mederle *et al.*, 2002).

O epitopo VP1 140-160 do vírus da febre aftosa foi expresso fusionado à proteína 18 kDa (Dellagostin *et al.*, 1993). A proteína de 18 kDa foi fusionada a epitopos de células B e T para a nucleoproteína do vírus rábico (18-kDa::B+T) e a expressão dirigida pelos promotores *hsp60* e 18 kDa. A expressão controlada pelo promotor *hsp60* resultou em um aumento do título de anticorpos até 60 dias após imunização (da Cruz *et al.*, 2001).

1.3.2.3. Imunidade induzida por BCG recombinante

Micobactérias de crescimento lento tais como BCG produzem uma forte imunidade de longa duração, principalmente devido a sua capacidade de sobreviver e se replicar por várias semanas ou meses no hospedeiro. Em alguns casos, focos viáveis de micobactérias podem persistir por anos isolados em granulomas.

Como um patógeno intracelular facultativo, a infecção micobacteriana foi demonstrada ser dependente do desenvolvimento de uma resposta de linfócitos T auxiliares tipo-1 (Th1), a qual é caracterizada pela elaboração de um perfil de citocinas incluindo interleucinas (IL) 2, 12, e interferon-gama (IFN- γ) (O'Donnell, 1997).

s (McCluskie, *et al.*, 2001)

CT, CTB, LT e LTB têm sido usadas como adjuvantes em estudos com *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, ovoalbumina, soroalbumina bovina e BCG (Ogra *et al.*, 2001; Biet, 2003).

Os efeitos adjuvantes da LT ainda são pouco conhecidos, mas parecem estar associados com a indução do AMPc com uma variedade de efeitos nas células (*et al.*, 2001).

Conceição *et al.* (2004) construíram uma vacina de subunidade recombinante composta pela região R1 da adesina P97 fusionada a subunidade B da toxina termolábil de *E. coli* (rLTB-R1) que induziu em camundongos altos níveis de

anticorpos séricos anti-R1, os quais reconheceram a P97 da cepa patogênica 7448 em Western blot. A imunização com rLTB-R1 por via I.N. ou I.M. induziu imunidade local e celular nos camundongos.

O uso de vetores vivos expressando a LTB pode representar uma indução duradoura da resposta com IgA, especialmente se os vetores tiverem a habilidade de persistirem por períodos prolongados. O BCG, uma das vacinas mais usadas no mundo, tem a habilidade de persistir por vários meses e anos após a administração e é usada para expressar antígenos heterólogos, denotando uma boa estratégia a utilização deste vetor expressando um gene de interesse e a LTB.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo Geral

Clonagem e expressão da região R1 da adesina P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* em *Mycobacterium bovis* BCG.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Clonar a região R1 da adesina P97 nos vetores de expressão pUS977, pUS2000 e pAU5.
- Clonar a região R1 fusionada a subunidade B da toxina termo-lábil de *E. coli* (LTB-R1) nos vetores de expressão pUS977, pUS2000 e pAU5.
- Transformar *M. bovis* BCG Pasteur com os vetores recombinantes.
- Verificar expressão das proteínas recombinantes através de Western blot.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Cepas bacterianas

As cepas bacterianas utilizadas encontram-se na tabela 1.

TABELA 1. Cepas bacterianas utilizadas neste trabalho

Cepas	Características Relevantes	Fonte/Referência
<i>E. coli</i> TOP 10 F ⁻	<i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen, USA
BCG Pasteur	Cepa vacinal	Universidade de Surrey, Inglaterra

2.1.2. Plasmídeos

Foram utilizados três vetores de expressão em micobactérias: pUS977, pUS2000 e pAU5 da Coleção do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia da UFPel. Todos os plasmídeos contêm uma origem de replicação em *E. coli* e em micobactéria, um sítio de múltipla clonagem e um gene de resistência à canamicina. O pUS977 apresenta o promotor P_{AN} isolado de *M. Paratuberculosis* e expressa a proteína no citoplasma. O pUS200 apresenta o promotor da proteína 18kDa e o plasmídeo pAU5 apresenta o promotor da proteína de choque térmico *hsp60* com uma mutação. Estes dois últimos também expressam a proteína no citoplasma.

2.1.3. “Primers”

Os “primers” foram elaborados segundo as seqüências disponíveis no GenBank e desenhados com o auxílio do programa Vector NTI 8.0 (Infomax Inc.). Os seguintes “primers” foram utilizados: **R1 forward:** 5’ CCTCACTCTAGAGATCCCTACAAAAG 3’; **R1 reverse:** 5’

GCCAAGCTTAGTAGCAACTGGT 3' e LTB-R1 forward: 5'
CACTCTAGATCCCCAGACTATTACAG 3'.

2.1.4. Enzimas

As enzimas utilizadas foram: *Taq* DNA polimerase, *T4* DNA ligase, *Xba*I, *Hind*III, *Eco*RI e *Bam*HI, fornecidas por hvtrogen; Fosfatase alcalina (CIP), fornecida por Boehringer Mannheim.

2.1.5. Kits utilizados

- GFX™ PCR DNA and Gel Band purification Kit (Amershan Biosciences): este kit foi utilizado para a extração das bandas de DNA dos géis de agarose e para remover sais, enzimas, nucleotídeos não incorporados e “primers” de produto de PCR. O DNA de interesse liga-se em uma matriz de fibra de vidro. A recuperação do DNA de interesse no final fica em torno de 60%. O protocolo utilizado foi conforme descrito pelo fabricante.

- Flexiprep™ Kit (Amershan Biosciences) : este kit foi utilizado para extração de DNA plasmidial.

2.1.6. Meios de Cultura

Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave à 121°C durante 15 minutos ou foram filtrados utilizando-se filtros descartáveis Millipore com um diâmetro de poro de membrana de 0,2 µm.

Meio Luria-Bertani (LB)

Triptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl	5 g
Água Milli-Q para Autoclavado.	1000 ml

Ágar Luria-Bertani

Meio Luria-Bertani adicionado de 15 g/litro de ágar bacteriológico, e autoclavado.

Meio SOC

Triptona	20 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	2,5 mM
MgSO ₄	10 mM
Glicose	20 mM
Água Milli-Q para	1000 ml

O meio SOC foi preparado e autoclavado na ausência do sal de magnésio e da glicose, os quais foram esterilizados por filtração e adicionados ao meio no momento da sua utilização.

Meio Middlebrook 7H9

7H9 Desidratado	4,7 g
Água Milli-Q para	900 ml
Tween 80 ^o	0,05 %
Glicerol	0,2 %

Após autoclavado e resfriado, OADC foi adicionado a uma concentração final de 10%.

Meio Mycobacteria 7H11 – Agar

7H11 Desidratado	21 g
Água Milli-Q para	900 ml
Glicerol	0,2 %

Após autoclavado, o meio foi resfriado até uma temperatura de aproximadamente 55°C e OADC foi adicionado a uma concentração final de 10% e o meio foi então distribuído nas placas de Petry.

2.1.7. Soluções Utilizadas

2.1.7.1. Soluções em geral

Antibióticos

O antibiótico utilizado foi canamicina nas concentrações de 50 µg/ml para meios cultivados com *E. coli* e de 25 µg/ml para meios cultivados com *M. bovis* BCG. Este foi preparado com água destilada estéril e esterilizado por filtração.

EDTA

EDTA 0,5 M

Com pH 8,0 e autoclavado.

Tampão TE

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

pH 8,0 com HCl. Autoclavado.

Fenol: Clorofórmio

Esta solução foi preparada com partes iguais de fenol e clorofórmio de acordo com a quantidade final desejada. A mistura foi tamponada com Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) e armazenada a 4°C.

SDS – Sodium Dodecil Sulphate

Uma solução de SDS a 10 % foi preparada em água Milli-Q.

Tris-HCl

Uma solução estoque de Tris-HCl a 1 M foi preparada em água Milli-Q, o pH foi ajustado com adição de HCl para o valor desejado para cada uso.

Hidróxido de Sódio

Uma solução estoque de NaOH 2 M foi preparada em água Milli-Q.

Glicose	50 mM
EDTA pH 8,0	10 mM

Solução II

NaOH	0,2 M
SDS	1,0 %

Solução III

Acetato de Sódio pH 5,2	3 M
-------------------------	-----

2.1.7.3. Soluções para eletroforese em gel de agarose

TBE 1X (Tris-borato)

Tris-borato	89 mM
Ácido Bórico	89 mM
EDTA	2 mM

Uma solução estoque 10X concentrada foi preparada, a qual foi diluída a 0,5X

Tampão de Amostra 6X

Azul de Bromofenol	0,25 %
Glicerol	40 %

Gel de Agarose

Agarose ultrapura	0,8 a 2,0 %
Tampão TBE 0,5X	60 ml
Brometo de Etídeo	0,5 µg/ml

2.7.1.4. Soluções para SDS-PAGE

Tampão de Amostra 2X

Glicerol (100%)	2,0 ml
-----------------	--------

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 2,5 ml
 β - Mercaptoetanol 0,4 ml
 Azul de bromofenol 0,02 g
 SDS 0,4 g
 Completar para 10ml de água milli-Q.

Tampão Tris-glicina (Tampão de Corrida)

Tris-base 25 mM
 Glicina 250 mM
 SDS 0,1 %

Solução Corante Coomassie Blue R250

Ácido glicínico glacial 10 %
 Brilhante Blue R250 0,05 %
 Metanol 50 %
 Água Milli-Q 40 %

Solução Descorante Coomassie Blue

Ácido acético glacial 7 %
 Metanol 5 %
 Água Milli-Q 88 %

2.7.1.5. Soluções para Western Blot

Tampão de Transferência

Glicina 39 mM
 Tris base 48 mM
 SDS 0,037 %
 Metanol 20 %

Solução de Ponceau S 10X

Ponceau S 2 g/l
 Ácido Tricloroacético 30 g/l
 Ácido Sulfosalicílico 30 g/l
 Água Milli-Q 100 ml

primer” reverso citado acima.

2.2.1.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Depois de sintetizados os “primers”, estes foram testados para a amplificação dos insertos R1 e LTB-R1.

As amostras foram submetidas ao termociclador *Mastercycler Gradient* da Eppendorf, segundo o programa a seguir:

3 min	→ 94°C	
30 s	→ 94°C.....desnaturação	} 30 ciclos
30 s	→ 48°C.....anelamento	
1 min	→ 72°C.....polimerização	
7 min	→ 72°C	

A reação da PCR foi realizada seguindo o protocolo descrito na tabela 2.

TABELA 2. Componentes da PCR

Componentes	Quantidade
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	0,4 µl
dNTP's (10mM)	0,5 µl
MgCl ₂	1,5 µl
Tampão da enzima 1X	5 µl
"primers" (300 ng/µl)	1 µl de cada
DNA molde*	1,5 µl
Água Milli-Q	39 µl

Foram aplicados 7 µl do produto de PCR e 2 µl de tampão de amostra 6X em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo na concentração de 0,5 µg/ml. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (BioRad) com tampão TBE 0,5X a 130V por 30 minutos.

2.2.1.2. Purificação de DNA com o "GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit"

A purificação do produto de PCR foi realizada adicionando-se 500 µl de tampão de captura (contendo acetato) no tubo de microcentrífuga de 1,5 ml contendo o DNA, e a seguir este foi transferido para uma coluna contendo um tubo coletor e centrifugou-se por 1 min a 14.000 rpm. O líquido do tubo coletor foi descartado e foi adicionado à coluna 500µl de tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA, etanol em concentração final de 80%). A seguir o sistema foi novamente

* O DNA molde utilizado foram os plasmídeos pENTRE/R1 e pENTRE/LTB-R1, já construídos e cedidos por Fabrício Rochedo Conceição.

centrifugado nas mesmas condições anteriores e o tubo coletor foi descartado. A coluna foi então transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e nela foi adicionado 30 µl de tampão de eluição (TE 1X), deixando este sistema incubado a temperatura ambiente por 1 min. Após houve nova centrifugação para que o DNA passasse da coluna para o tubo. O DNA foi armazenado a – 20°C.

2.2.1.3. Digestão dos fragmentos *r1* e *ltb-r1*

Para que as extremidades dos fragmentos ficassem compatíveis com as dos vetores pUS977, pUS2000 e pAU5, foi realizado uma digestão com as enzimas de *XbaI* e *HindIII*.

A reação de digestão foi realizada em volume final de 40 µl. Para tal foram utilizados 30 µl de DNA, 1 µl de cada enzima, 4 µl de tampão de reação 10X e 4 µl de água Milli-Q. A reação foi incubada a 37°C, em banho-maria, “overnight” e 5 µl do produto foram analisados em gel de agarose 0,8 %.

2.2.1.4. Purificação dos fragmentos digeridos com o “GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit”

Após a digestão dos fragmentos R1 e LTB-R1 com as enzimas de restrição, foi realizado a purificação destes seguindo o protocolo descrito no item 2.2.1.2.

2.2.2. Preparo dos vetores

2.2.2.1. Digestão dos vetores

Os vetores de expressão utilizados foram os plasmídeos pUS977, pUS2000 e pAU5. Para que a ligação dos vetores aos insertos fosse obtida com sucesso, os plasmídeos foram também digeridos com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII*.

A reação de digestão foi realizada em volume final de 50 µl para cada vetor. Para tal foram utilizados 40 µl de cada DNA, 1 µl de cada enzima, 5 µl de tampão de reação 10X e 3 µl de água Milli-Q. A reação foi incubada a 37°C, em banho-maria, “overnight” e 5 µl do produto foram analisados em gel de agarose 0,8 %.

2.2.2.2. Tratamento dos vetores com Fosfatase Alcalina (CIP)

Para garantir que durante a ligação os plasmídeos não se religassem foi adicionado 100 μl de tampão com CIP ("Calf Intestinal Alkaline Phosphatase). Esta enzima retira os grupos fosfato das extremidades da fita de DNA e assim evita a recircularização do plasmídeo. Os plasmídeos foram purificados para retirar o tampão e as enzimas de restrição da digestão. Foi, então, adicionado à solução 100 μl da enzima CIP e 4 μl do seu tampão de reação 5X. A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C em banho-maria.

2.2.2.3. Inativação da enzima fosfatase alcalina (CIP)

Este procedimento foi necessário, pois na reação de ligação a CIP poderia retirar os fosfatos das extremidades dos insertos e impedir a ligação dos mesmos aos vetores.

Esta prática foi realizada adicionando à cada solução 1 μl de EDTA 0,5 M e incubando-se em banho-maria a 75°C por 10 min. Após, foi realizada uma nova purificação dos vetores tratados com CIP com o "GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit", seguindo a metodologia descrita no item 2.2.1.2. Três microlitros do produto tratado foi analisado em gel de agarose 0,8 %.

2.2.3. Reação de Ligação

A ligação do DNA foi realizada utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) num volume final de 20 μl, incubados a 16°C por 2 horas. A proporção de inserto: vetor de 2:1.

Um controle de cada plasmídeo foi realizado, ligando-se somente os vetores (sem insertos).

2.2.4. Transformação de *E. coli* TOP10

As células eletrocompetentes foram removidas do banho a 70°C e descongeladas em gelo. Um μl do produto de cada ligação foi adicionado diretamente a 50 μl *E. coli* TOP10 para transformação. A mistura foi colocada em cubetas para eletroporação e submetidas a 2.5 kV, 25 μF e 200 ohms, no eletroporador Gene Pulser II (BioRad). Imediatamente após a eletroporação as células foram cultivadas em 550 μl de meio SOC, transferidas para tubos de micro-centrífugas de 1,5 ml e incubadas em

de amostra 1X contendo 10 µg/ml de RNase e 15 µl de fenol:clorofórmio. Foi misturado em vórtex e centrifugado por 5 minutos a 14.000 x g. Em seguida foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% aplicando-se a fase superior.

As colônias que apresentaram inserto foram expandidas em meio LB líquido estéril com canamicina 50 µg/ml, mantidas sob agitação (200 rpm) por 16 horas a 36°C, para posterior extração de DNA plasmideal.

2.2.4.2. Extração de DNA plasmideal por lise alcalina utilizando “Flexiprep™ Kit”

E. coli da placa contendo meio seletivo que aparentemente apresentaram insertos foram cultivadas em 3 ml de meio LB conforme descrito acima. Após, foi transferido 1,5 ml da cultura para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e este foi centrifugado por 1 min a 14.000 rpm. A seguir o sobrenadante foi removido e o “pellet” ressuspendido em 200 µl de Solução I em vórtex. Após, foram adicionados 200 µl da Solução II e o tubo foi gentilmente invertido por 10 a 15 vezes. A seguir foram adicionados 200 µl da Solução III e o tubo invertido por 10 a 15 vezes. A solução foi centrifugada por 5 min a 14.000 rpm e o sobrenadante transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpo. Ao sobrenadante adicionou-se 420 µl de isopropanol, sendo a solução homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 10 min. A seguir a solução foi centrifugada por 5 min. a 14.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” foi deixado secar a temperatura ambiente por cerca de 5 min. Após, foram adicionados 150 µl de Sephaglas e o tubo invertido gentilmente por 1 min até dissolver o “pellet”. A solução foi centrifugada por 15 s a 14.000 rpm e o sobrenadante removido. O “pellet” foi

lavado com 200 μ l de tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl pH 7,5; EDTA 2 mM; NaCl 200 mM e etanol para uma concentração final de 60%) e em seguida o tubo foi agitado gentilmente para ressuspender o “pellet”. A solução foi então centrifugada e o sobrenadante removido. O tubo foi agitado com as mãos para ressuspender mais uma vez o “pellet” e incubado por 10 min a temperatura ambiente a fim de que secasse. Adicionaram-se 50 μ l de TE 1X e agitou-se o tubo com as mãos periodicamente. A seguir houve nova centrifugação e o sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga limpo. O líquido foi observado contra a luz e a centrifugação repetida caso houvesse restado resquícios de Sephaglas na suspensão. Os plasmídeos foram armazenados a

2.2.4.3. Digestão para confirmação dos clones recombinantes

A confirmação dos recombinantes foi feita através de digestões com enzimas de restrição. Foi utilizada a enzima *EcoRI* para os plasmídeos pUS977/R1, pUS2000/R1 e pAU5/R1 e a enzima *BamHI* para os plasmídeos pUS977/LTB-R1, pUS2000/LTB-R1 e pAU5/LTB-R1. A reação de digestão foi incubada em banho-maria a 37°C, “overnight”. Foram digeridos somente os plasmídeos como controles. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%.

2.2.5. Transformação de *M. bovis* BCG Pasteur

2.2.5.1. Preparo de células competentes

Com uma ponteira estéril retirou-se uma amostra de uma colônia de BCG e esta foi ressuspensa em tubos (Falcon, tipo 2059) contendo 50 ml de meio Middlebrook 7H9, adicionado de 0,05% de Tween 80, 0,2% de glicerol e 10% de OADC. A cultura foi incubada em agitação por 5 dias a 36°C. Após uma incubação em gelo de 20 min as células foram colhidas por centrifugação a 4.000 x *g* por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado com 50 ml de água estéril, as células foram colhidas por nova centrifugação seguindo as mesmas eriores. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspensa em 25 ml de glicerol 10% e houve nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensa em 0,6 ml de glicerol 10% e divididos em alíquotas de 100 μ l para posterior transformação.

2.2.5.2. Eletroporação de BCG competente

O eletroporador Gene Pulser II (Bio Rad) foi utilizado para a eletroporação de *M. bovis* BCG. Em cubetas de eletroporação misturou-se 1,5 µl de DNA a 100 µl de células competentes. O eletroporador foi ajustado para 2,5 kV, 25 µF e 800 ohms. Imediatamente após a eletroporação, as células foram diluídas em 0,5 ml de meio 7H9 e foram incubadas a 36°C por 2 dias. Após a -400 µl foram plaqueados em meio 7H11 contendo o antibiótico de seleção apropriado e os transformantes resistentes foram selecionados após 20 dias a 36°C e inoculados em 10 ml meio 7H9, contendo o antibiótico canamicina, deixados crescer a 36° por 10 dias.

2.2.6. Análise por “Western Blot”

lise foi realizada com o objetivo de verificar a expressão das proteínas pelos recombinantes.

2.2.6.1. Eletroforese em gel de Poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida foram preparados utilizando o sistema de mini-gel (BioRad), a uma concentração de 5% para o gel de empilhamento e 15% para o gel de separação conforme tabela 4 e 5.

TABELA 4. Componentes do Gel de Separação (15%) de Poliacrilamida

Componentes	Quantidade para um gel
30% Acrilamida Mix	2,5ml
1.5 mM Tris (pH 8.8)	1,3 ml
10% SDS	0,05 ml
10% Persulfato de amônio	0,05 ml
TEMED	0,002 ml
Água milli Q	1,1 ml

TABELA 5. Componentes do Gel de Empilhamento (5%) de Poliacrilamida

Componentes	Quantidade para um gel
30% Acrilamida Mix	0,17 ml
1.5 mM Tris (pH 6,8)	0,13 ml
10% SDS	0,01 ml
10% Amonium persulfato	0,01 ml
TEMED	0,001 ml
Água milli Q	0,68 ml

Para preparação das amostras foram coletados 5 ml de meio de cultivo com BCG e centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspendido em 500 μ l de Tris-HCl pH 7,5 para auxiliar na lise celular. Esta solução foi submetida à lise por sonicação (High Intenity Ultrasonic Processor) de 15 s por três vezes cada amostra. Vinte microlitros deste preparado foram misturados a 20 μ l do tampão de amostra 2X e fervidos por 5-10 min. Após uma breve centrifugação, o sobrenadante foi aplicado no gel de poliacrilamida ou então armazenado a -20°C . As amostras armazenadas a -20°C foram -aquecidas a 100°C por 5 min antes de sua aplicação no gel.

Um volume de amostra de 15-20 μ l foi utilizado e para comparação dos pesos moleculares, 7 μ l do marcador de peso molecular Prestain (Invitrogen) foi aplicado em cada gel. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida a 50V até que o corante do tampão de amostra tivesse passado do gel de empilhamento e a 140 V até a 1 cm do fim do gel (cerca de 60 min).

2.2.6.2. Transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose

Logo após a eletroforese, os géis foram incubados por 10 min em tampão de transferência e um filtro Whatmam 3 MM e uma membrana de nitrocelulose Hybond™ HCL™ (Amersham Biosciences) do tamanho de cada gel foram cortados e também incubados em tampão de transferência. Para realização da transferência, o ‘sanduíche’ foi montado na seguinte ordem: um papel filtro, a membrana de nitrocelulose, o gel de poliacrilamida e o segundo papel filtro, todos saturados pelo tampão de transferência. O processo foi realizado em um “Bio-Rad Trans-Blot cell”. Os sanduíches foram colocados dentro de seguradores, com os géis voltados para o lado negativo, e imersos dentro de uma cuba com tampão de transferência. Esta foi

definitiva, podendo ser removida com uma simples lavagem em TBS-T. Após a coloração com ponceau S e lavagem, as membranas foram incubadas por no mínimo 30 min em solução bloqueadora de caseína 5% para saturar liga -

2.2.6.3. Detecção imunológica

Após a incubação com solução bloqueadora, foram realizadas 3 lavagens com TBS-T 1X de 5 min cada. As membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e sob leve agitação, com 15 ml de TBS-T cada uma, contendo a diluição apropriada do anticorpo primário (MAb F1B6), seguida por 3 lavagens de 5 min cada em TBS-T. As membranas foram, então, incubadas por 1 hora em 15 ml de TBS-T contendo a diluição apropriada do anticorpo secundário conjugado com peroxidase. O excesso do anticorpo secundário foi removido com 3 lavagens de 5 min cada em TBS-T, e a solução reveladora CPD-SartTM Dectection reagent (Amersham LIFE SCIENCE) foi adicionada na relação de 30 a 40 μ l por cm^2 de cada membrana e incubados por 2 min. As membranas foram expostas a um filme de raio-X por 2 a 5 min. Em seguida o filme de raio-X foi submetido a uma solução reveladora até que as bandas das proteínas se tornassem visíveis. Após, os filmes ficaram expostos a uma solução fixadora por 1 min, seguidos por uma lavagem em água para retirar o excesso de sal contido na solução fixadora.

Dependendo da intensidade do sinal, outras exposições foram realizadas. No caso de solução reveladora ser cromogênia, as membranas foram incubadas por 1-5 min nesta solução até que as bandas de proteínas se tornassem visíveis e a reação foi interrompida com uma lavagem em água destilada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Resultados

3.1.1. Obtenção e preparo das seqüências gênicas *r1* e *ltb-r1*

3.1.1.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Purificação de DNA com o TM PCR and Gel Band Purification Kit

A amplificação foi realizada seguindo a metodologia descrita no item 2.2.1.2.

O resultado da amplificação pode ser visualizado na figura 1.

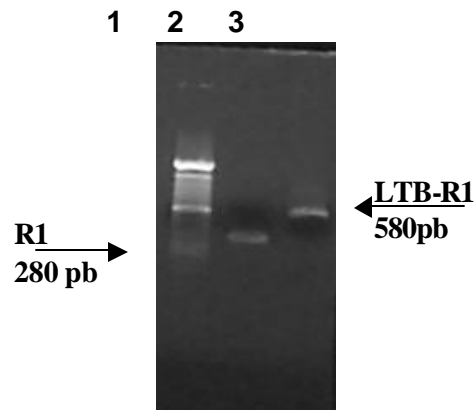


FIGURA 1. Amplificação do gene que codifica a região R1 e do gene híbrido que codifica a LTB-R1 por PCR. Eletroforese em gel de agarose 0,8%: 1. Marcador de massa molecular 100 pb DNA ladder (Invitrogen); 2. *r1* e 3. *ltb-r1*.

Analisando-se a figura acima, verifica-se que houve uma amplificação e purificação dos genes dentro do resultado esperado.

3.1.1.2. Digestão e Purificação de DNA com o “GFXTM PCR and Gel Band Purification Kit”

As digestões dos fragmentos com enzimas de restrição encontram-se descritas no item 2.2.1.3. e, após realizou-se nova purificação do DNA, segundo protocolo descrito no item 2.2.1.4. e analisaram-se 5 µl do produto em gel de agarose. Embora tivesse ocorrido perda de DNA durante o processo de digestão e purificação do fragmento amplificado por PCR, o material obtido no final do processo foi suficiente para a realização das etapas seguintes de clonagem nos diferentes vetores.

3.1.2. Preparo dos vetores

O mapa dos vetores, gerados com o auxílio do programa de computador Vector NTI 8.0 (Infomax Inc.), podem ser observados na figura 2.

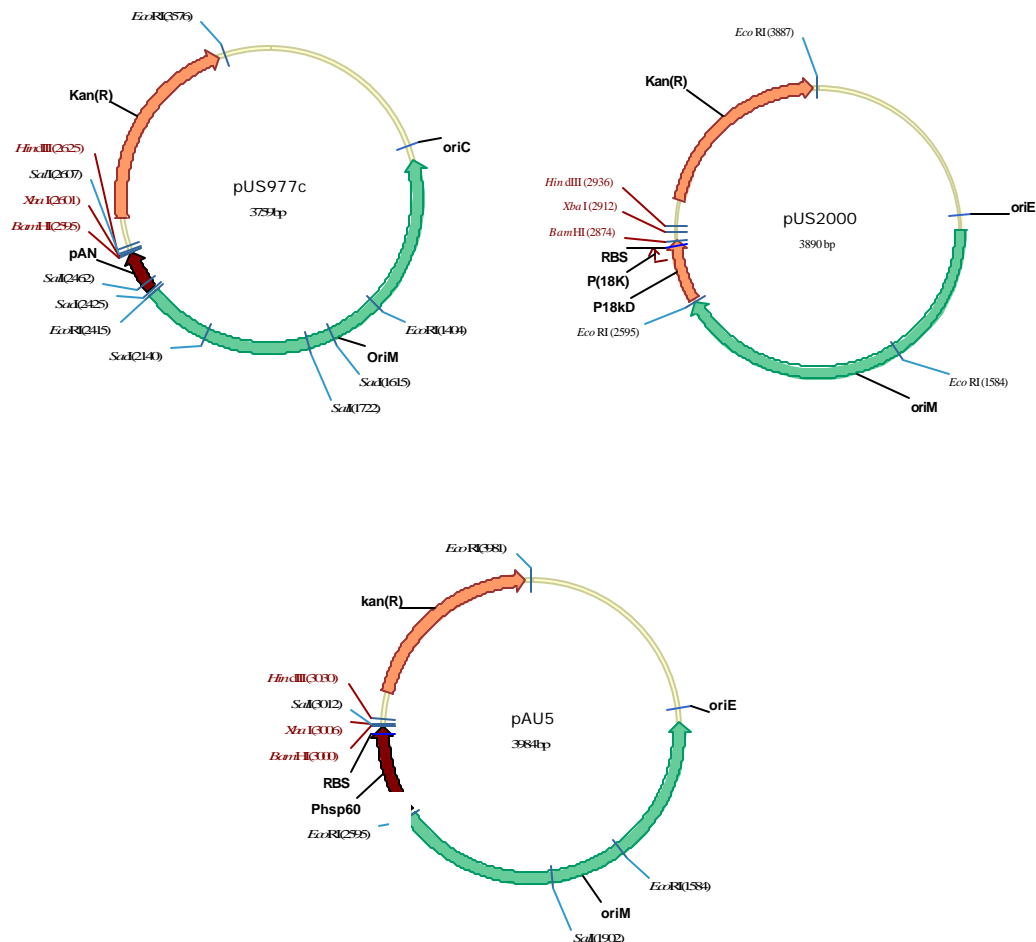


FIGURA 2: Desenho esquemático do vetor pUS977, pUS2000 e pAU5 gerado pelo software Vector NTI 8.0.

3.1.3. Construção dos vetores de expressão

Os vetores escolhidos foram pUS977, pUS2000 e pAU5, pois estes possuem respectivamente os promotores P_{AM} , 18 kDa e *hsp60* mutado, todos de expressão citoplasmática.

A utilização de promotores diferentes permite a avaliação dos diferentes sistemas de expressão, ou seja, a maneira na qual o antígeno é expresso, aliado a outros

fatores como antígeno exógeno utilizado, via de administração da vacina, que pode ter grande importância na indução de uma resposta imune, tanto quantitativamente como qualitativamente.

O produto da ligação descrita no item 2.2.3. foi utilizado para transformar *E. coli* TOP10. Foi realizada uma triagem rápida com fenol: clorofórmio e selecionadas algumas colônias recombinantes que foram cultivadas e submetidas a extração do DNA plasmidial. O DNA extraído teve clones submetidos à clivagem com *EcoRI* e *BamHI* (figuras 3 e 4).

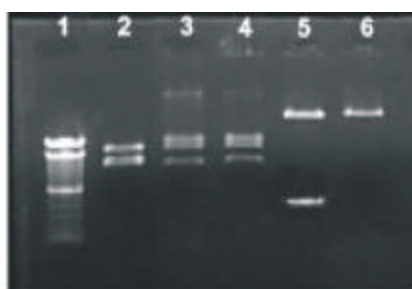


FIGURA 3: Gel de agarose 1%. Digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. 1. Marcador de massa molecular 100 pb DNA ladder (Invitrogen); 2. Clone pUS977 digerido com *EcoRI*; 3 e 4. Clones recombinantes pUS977/R1 digeridos com *EcoRI*; 5. Clone recombinante pUS2000/LTB-R1 digerido com *BamHI*; 6. Clone pUS2000 digerido com *BamHI*.

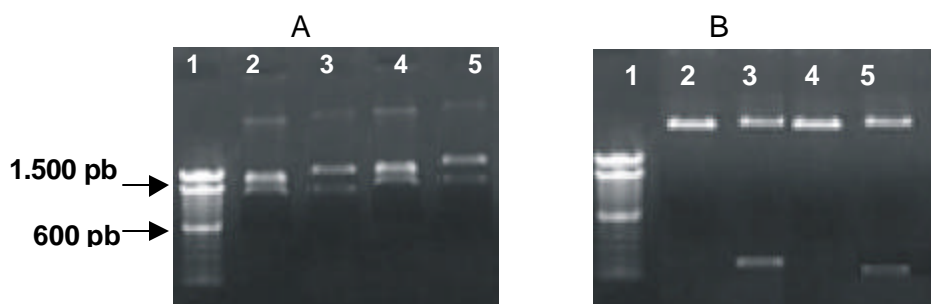


FIGURA 4: Gel de agarose 1%. Digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. A: 1. Marcador de massa molecular 100 pb DNA ladder (Invitrogen); 2. Clone pUS2000 digerido com *EcoRI*; 3. Clone recombinante pUS2000/R1 digerido com *EcoRI*; 4. Clone pAU5 digerido com *EcoRI*; 5. Clone recombinante digerido com *EcoRI*; B: 1. Marcador de massa molecular 100pb DNA ladder (Invitrogen); 2. Clone pUS977 digerido com *BamHI*; 3. Clone recombinante pUS977/LTB-R1 digerido com *BamHI*; 4. Clone pAU5 digerido com *BamHI*; 5. Clone recombinante pAU5/LTB-R1 digerido com *BamHI*.

Os clones que apresentaram as bandas esperadas foram selecionados e os plasmídeos construídos foram denominados de pUS977/R1, pUS2000/R1, pAU5/R1 (figura 5), pUS977/LTB-R1, pUS2000/LTB-R1 e pAU5/LTB-R1 (figura 5 e 6).

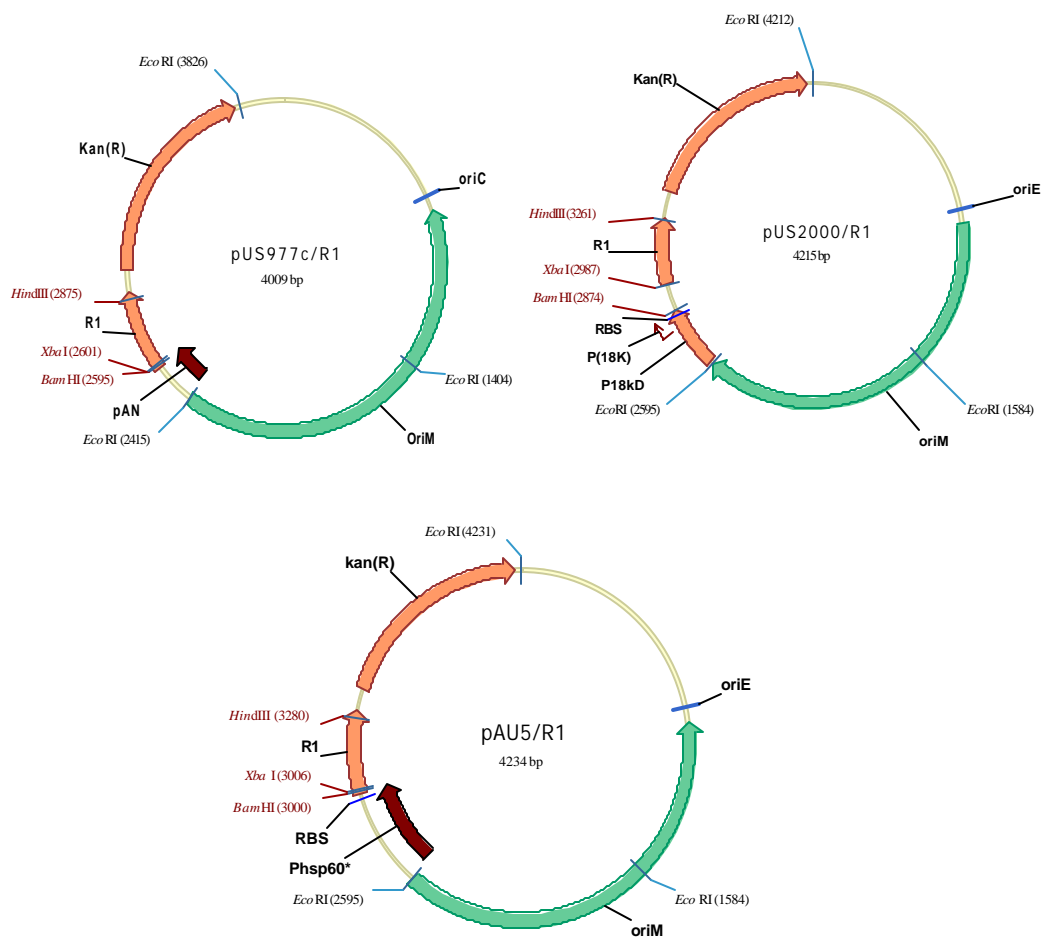


FIGURA 5: Desenho esquemático do vetor pUS977/R1, pUS2000/R1, pAU5/R1 gerado pelo software Vector NTI 8.0.

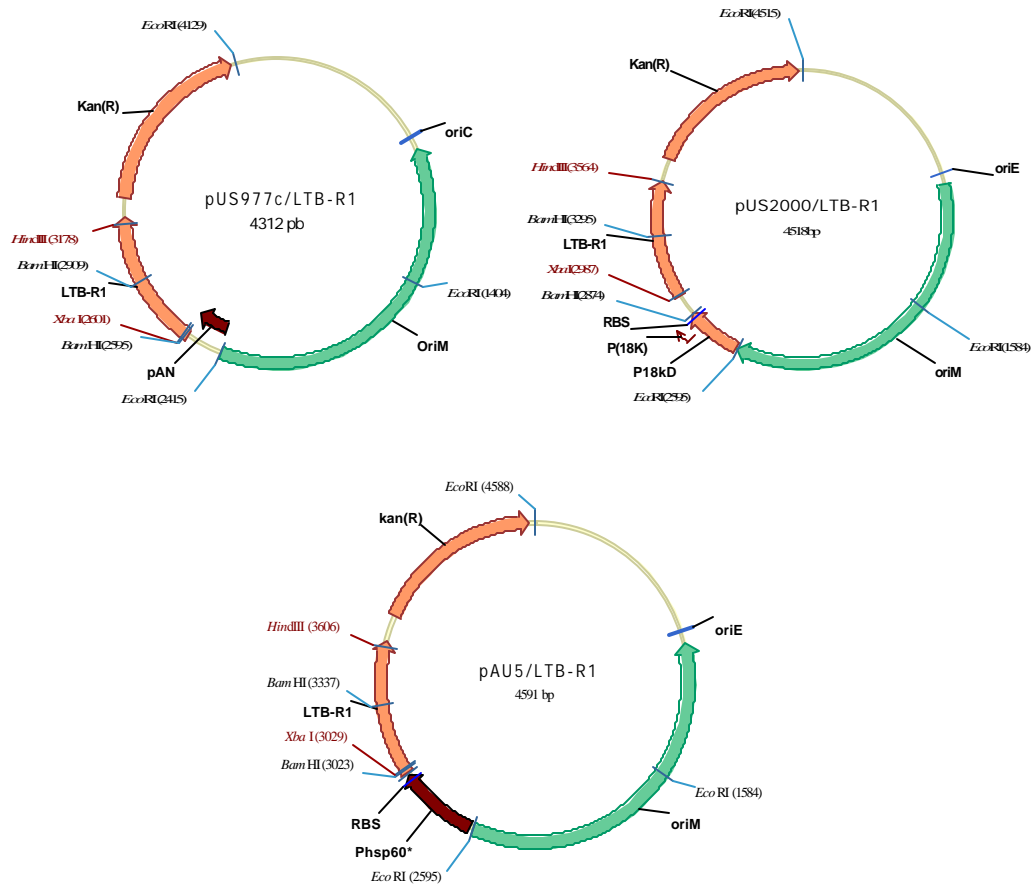


FIGURA 6: Desenho esquemático do vetor pUS977/LTB-R1, pUS2000/LTB-R1 e pAU5/LTB-R1 gerado pelo software Vector NTI 8.0.

3.1.3.1. Transformação de *M. bovis* BCG Pasteur

Um clone recombinante de cada plasmídeo de expressão construído foi utilizado para transformar *M. bovis* BCG competente. Embora durante a manipulação dos meios de cultivo possa ocorrer a contaminação com outras bactérias de crescimento rápido, e assim haver saturação e/ou competição dos nutrientes, impedindo que o BCG (que é de crescimento lento), se estabeleça, a transformação ocorreu com sucesso e sem maiores problemas.

3.1. 4. Expressão das proteínas recombinantes

A expressão das proteínas foi analisada através de “Western Blot”, com MAb F1B6. O resultado desse teste demonstrou no filme de raios-X, bandas nas alturas esperadas, compatível com o tamanho das proteínas, que eram de 14 kDa para a

rR1 e 25 kDa para a rLTB-R1. Isto demonstra que o anticorpo monoclonal anti-R1 reconheceu as proteínas expressas em BCG (figuras 7). Tanto para a R1 como para a LTB-R1 verificou-se expressão; embora para o plasmídeo pAU5/R1 a expressão parece ter sido baixa.

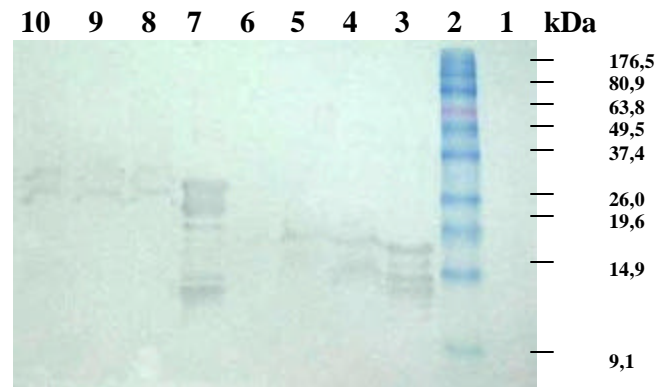


FIGURA 7: “Western Blot” de transformantes de *M. bovis* BCG Pasteur expressando a região R1 da adesina P97, e região R1 fusionada a subunidade B da toxina *E. coli* (LTB-R1): 1. *M. bovis* BCG não transformado; 2. Protein Ladder (Invitrogen); 3. R1; 4. *M. bovis* BCG/pUS977-R1; 5. *M. bovis* BCG/pUS2000-R1; 6. *M. bovis* BCG/pAU5-R1; 7. LTB-R1; 8. *M. bovis* BCG/pUS977 LTB-R1; 9. *M. bovis* BCG/pUS2000 LTB-R1; 10. *M. bovis* BCG/pAU5LTB-R1.

3.2. Discussão

A pneumonia enzoótica suína é uma doença respiratória de suínos de ampla ocorrência. As perdas econômicas causadas no país justificam o uso de vacinas em populações de animais em risco. Para isto antígenos vêm sendo investigados para verificar o potencial no uso em vacinas (Bouh *et al.*, 2003; Conceição *et al.*, 2004; Fagan *et al.*, 1997; King *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2002).

Conceição *et al.*, (2004) construíram uma vacina de subunidade recombinante rLTB-R1. Esta vacina induziu em camundongos altos níveis de anticorpos séricos anti-R1, os quais reconheceram a P97 da cepa patogênica 7448 no Western blot.

Neste trabalho foram construídos vetores de expressão em *M. bovis* BCG contendo a região R1 da adesina P97 de *M. hyopneumoniae* e analisado sua expressão, uma vez que este antígeno já demonstrou ser um forte candidato a vacina (Conceição *et al.*, 2004).

A fase de amplificação dos genes, foi necessário otimizar a PCR, uma vez que várias bandas de diferentes tamanhos foram também amplificadas, assim foi

testado diferentes temperaturas de anelamento, chegando numa temperatura que demonstrou ser a mais eficaz, que foi 48° C.

Por ser de crescimento lento, a manipulação dos meios de cultivo para *M. bovis* (BCG) é muito delicada, pois pode ocorrer a contaminação com outras bactérias de crescimento rápido, e assim haver saturação e/ou competição dos nutrientes, impedindo que o BCG se estabeleça. Embora isso possa acontecer, a transformação ocorreu com sucesso, sem contaminações.

Para avaliar o potencial do BCG recombinante como carreador do antígeno R1 de *M. hyopneumoniae*, bem como do fusionado LTB-R1, foram testados três vetores de expressão em micobactérias: pUS977, pUS2000 e pAU5. Os plasmídeos recombinantes foram caracterizados e introduzidos em BCG para testar a expressão *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tanto para a proteína R1 quanto para a proteína R1 fusionada a subunidade B da toxina termolábel de *E. coli*, a expressão foi eficiente sob o controle dos diferentes promotores, com níveis equivalentes de expressão *in vitro*. Os rBCG/r1 expressaram 4 bandas com massa molecular entre 14 e 19 kDa, sendo que a massa esperada era de 14 kDa. Os rBCG/*ltb-r1* expressaram bandas de 25 e 30 kDa, bem como bandas de alo massa molecular correspondentes a oligomerização da rLTB-R1. A massa da LTB-R1 era de 25 kDa. Este mesmo resultado foi obtido na expressão destas proteínas em *E. coli*, sugerindo uma hipotética modificação pós traducional.

O plasmídeo pUS977 apresenta o promotor P_{AN} de *Mycobacterium paratuberculosis*, que foi primeiramente isolado e caracterizado por Murray *et al.* (1992) e utilizado para expressar o gene *lacZ* de *E. coli*. A imunização de camundongos com BCG recombinante resultou na indução de uma forte resposta imune humoral e celular contra a β -galactosidase. Desde então tem sido utilizado para expressar antígenos heterólogos de diferentes patógenos (Winter *et al.*, 1995). O rBCG que continha o plasmídeo pUS977, promotor P_{AN} , apresentou bons níveis de *in vitro* tanto para R1 quanto para LTB-R1. Estes resultados confirmam estudos anteriores os quais indicam que o promotor P_{AN} , apresenta potencial para direcionar a expressão de antígenos heterólogos em BCG (da Cruz *et al.*, 2001).

Medeiros *et al.* (2002), compararam a atividade de diferentes promotores de micobactérias através da atividade da β -galactosidase e constataram que em BCG, o promotor *hsp60* apresenta uma atividade cinco vezes superior aos promotores 18kDa e P_{AN} . Igualmente, Bastos *et al.*, (2002, 2004) utilizaram o

plasmídeo pUS973 (promotor *hsp60*), para expressar o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória de suínos e obtiveram níveis elevados de expressão *in vitro*. O BCG recombinante, cujo plasmídeo continha o promotor *hsp60* (embora com uma mutação), é o pAU5, que parece ter tido um bom nível de expressão, *in vitro*, para o antígeno R1. Seixas (2004), que expressou o antígeno LIPL32 de *Leptospira interrogans* em BCG, utilizando três diferentes promotores: *hsp60*, *hsp60* e seqüência sinal (MT19) e P_{AN} . Sendo que todos apresentaram expressão *in vitro*, porém o promotor *hsp60* apresentou um menor nível de expressão, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

O BCG recombinante, cujo plasmídeo continha o promotor 18kDa, apresentou tanto para o antígeno R1, quanto para o antígeno LTB-R1, o que confirma estudos anteriores às quais indicam que o promotor 18kDa tem alta atividade em *M. bovis* BCG, *M. vaccae* e *M. smegmatis* (Medeiros *et al.*, 2002).

Devido a sensibilização à tuberculo-proteínas, atualmente o BCG não pode ser usado como vacina em animais pois impossibilita a distinção entre animais vacinados e animais doentes. No entanto, estudos com deleção de genes vem sendo realizados para que se possa diferenciar as cepas de BCG selvagem das cepas de BCG vacinal. Neste contexto, por ser uma vacina administrada rotineiramente, é veículo de apresentação de antígenos recombinates de fácil e

Tanto os rBCG/*r1* quanto os rBCG/*ltb-r1* tiveram sua expressão confirmada e s equivalentes de expressão, encorajando estudos futuros como candidatos à vacina recombinante contra a pneumonia enzoótica suína.

4. CONCLUSÃO

- Tanto a região R1 da adesina P97 de *M. hyopneumoniae*, quanto o híbrido LTB-R1 foram expressos por *M. bovis* BCG Pasteur.

5. PERPECTIVAS FUTURAS

Vacinas recombinantes usando estes vetores estão sendo preparadas e serão posteriormente inoculadas em camundongos e sua capacidade de induzir resposta imune será investigada.

6. REFERÊNCIAS

Abdelhak S, Louzir H, Timm J. **Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice.** Microbiology 1995;141 (Pt 7):1585-92.

Aldovini A, Young RA. **Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines.** Nature 1991;351(6326):479-82.

Bastos RG, Dellagostin OA, Barletta RG, Doster AR, Nelson E, Osorio FA. **Construction and immunogenicity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive respiratory syndrome virus.** Vaccine 2002;21(1-2):21-9.

Bastos RG, Dellagostin OA, Barletta RG, et al. **Immune response of pigs inoculated with *Mycobacterium bovis* BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.** Vaccine 2004;22(3-4):467-74.

Baulard A, Kremer L, Supply P, et al. **A new series of mycobacterial expression vectors for the development of live recombinant vaccines.** Gene 1996;176(1-2):149-54.

Baulard A, Kremer L, Locht C. **Efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria.** J.Bacteriol. 1996;178(11):3091-8.

Biet F, Kremer L, Wolowczuk I, Delacre M, Locht C. ***Mycobacterium bovis* BCG producing interleukin-18 increases antigen-specific gamma interferon production in mice.** Infect.Immun. 2002;70(12):6549-57.

Biet F, Kremer L, Wolowczuk I, Delacre M, Locht C. **Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing the cholera toxin B subunit.** Infect.Immun. 2003;71(5):2933-7.

Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF, Guilloteau LA. **Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC).** Vet.Res. 2005;36(3):411-36.

Bloom BR. **New approaches to vaccine development.** Rev.Infect.Dis. 1989;11 Suppl 2:S460-S466

Bloom BR, Jacobs WR, Jr. **New strategies for leprosy and tuberculosis and for development of bacillus Calmette-Guerin into a multivaccine vehicle.** Ann.N.Y.Acad.Sci. 1989;569:155-73.

da Cruz FW, McBride AJ, Conceicao FR, Dale JW, McFadden J, Dellagostin OA. **Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of an humoral response in mice.** Vaccine 2001;20(5-6):731-6.

Dellagostin OA, Wall S, Norman E, O'Shaughnessy T, Dale JW, McFadden J. **Construction and use of integrative vectors to express foreign genes in mycobacteria.** Mol.Microbiol. 1993;10(5):983-93.

Dellagostin OA, Esposito G, Eales LJ, Dale JW, McFadden J. **Activity of mycobacterial promoters during intracellular and extracellular growth.** Microbiology 1995;141 (Pt 8):1785-92.

Djordjevic, S.P., cordwell, S.J., djordjevic, M.A., et al. **Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesion.** Infection and Immunity, 2004, 72, p. 2791-2802.

Fagan PK, Djordjevic SP, Chin J, Eamens GJ, Walker MJ. **Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF).** Infect.Immun. 1997;65(6):2502-7.

Formal SB, Hale TL, Kapfer C, et al. **Oral vaccination of monkeys with an invasive *Escherichia coli* K-12 hybrid expressing *Shigella flexneri* 2a somatic antigen.** *Infect.Immun.* 1984;46(2):465-9.

Germanier R, Fuer E. **Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine.** *J.Infect.Dis.* 1975;131(5):553-8.

Goodwin RF. **The phenomenon of suppressed respiratory disease in the litters of older sows.** *Vet.Rec.* 1965;77:383-7.

Goodwin RF, Whittlestone P. **Experiments on the possible relationship between inclusion-body rhinitis, enzootic pneumonia and type-xi pneumonia of pigs.** *Res.Vet.Sci.* 1965;35:100-7.

Honda M, Matsuo K, Nakasone T, et al. **Protective immune responses induced by secretion of a chimeric soluble protein from a recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vector candidate vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in small animals.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92(23):10693-7.

Honda M, Kitamura K, Okamoto Y, et al. **Induction of protective immune responses by a chimeric soluble protein from a recombinant BCG vector candidate vaccine to HIV-1.** *Rinsho Ketsueki* 1995;36(5):435-41.

Hsu T, Artiushin S, Minion FC. **Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*.** *J.Bacteriol.* 1997;179(4):1317-23.

Hsu T, Minion FC. **Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin.** *Infect.Immun.* 1998;66(10):4762-6.

Hsu T, Minion FC. **Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*.** *Gene* 1998;214(1-2):13-23.

Husson RN, James BE, Young RA. **Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria.** *J.Bacteriol.* 1990;172(2):519-24.

Jacobs WR, Jr., Snapper SB, Lugosi L. **Development of genetic systems for the mycobacteria.** *Acta Leprol.* 1989;7 Suppl 1:203-7.

Kameoka M, Nishino Y, Matsuo K, et al. **Cytotoxic T lymphocyte response in mice induced by a recombinant BCG vaccination which produces an extracellular alpha antigen that fused with the human immunodeficiency virus type 1 envelope immunodominant domain in the V3 loop.** *Vaccine* 1994;12(2):153-8.

Kremer L, Riveau G, Baulard A, Capron A, Loch C. **Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant bacillus Calmette-**

Guerin producing the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. J.Immunol. 1996;156(11):4309-17.

Labidi A, David HL, Roulland-Dussoix D. **Restriction endonuclease mapping and cloning of *Mycobacterium fortuitum* var. *fortuitum* plasmid pAL5000.** Ann.Inst.Pasteur Microbiol. 1985;136B(2):209-15.

Langermann S, Palaszynski S, Sadziene A, Stover CK, Koenig S. **Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*.** Nature 1994;372(6506):552-5.

Lee MH, Pascopella L, Jacobs WR, Jr., Hatfull GF. **Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guerin.** Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1991;88(8):3111-5.

Lugosi L. **Theoretical and methodological aspects of BCG vaccine from the discovery of Calmette and Guerin to molecular biology.** A review. Tuberc.Lung Dis. 1992;73(5):252-61.

Lugosi L. **Relative persistence capacity of BCG substrains in mouse spleen. Computerized statistical analysis. Multiple comparison.** Can.J.Microbiol. 1992;38(3):165-73.

Mare CJ, Switzer WP. **New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*: a causative agent of virus pig pneumonia.** Vet.Med.Small Anim Clin. 1965;60:841-6.

Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A. **Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria.** Infect.Immun. 1990;58(12):4049-54.

Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Terasaka K, Yamada T. **Cloning and expression of the gene for the cross-reactive alpha antigen of *Mycobacterium kansasii*.** Infect.Immun. 1990;58(2):550-6.

Mazzantini RP, Miyaji EN, Dias WO, et al. **Adjuvant activity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing CRM197 on the immune response induced by BCG expressing tetanus toxin fragment C.** Vaccine 2004;22(5-6):740-6.

McCluskie MJ, Weeratna RD, Clements JD, Davis HL. **Mucosal immunization of mice using CpG DNA and/or mutants of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* as adjuvants.** Vaccine 2001;19(27):3759-68.

McFadden J, Collins J, Beaman B, Arthur M, Gitnick G. **Mycobacteria in Crohn's disease: DNA probes identify the wood pigeon strain of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* from human tissue.** J.Clin.Microbiol. 1992;30(12):3070-3.

Medeiros MA, Dellagostin OA, Armoa GR, et al. **Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics.** Microbiology 2002;148(Pt 7):1999-2009.

Mederle I, Bourguin I, Ensergueix D, et al. **Plasmidic versus insertional cloning of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: impact on in vivo antigen persistence and immune responses.** Infect.Immun. 2002;70(1):303-14.

Messier S & Ross RF. **Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes.** Am.J. Vet. Res. 1991, v. 52, p. 1497-1502.

Minion FC, Adams C, Hsu T. **R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia.** Infect.Immun. 2000;68(5):3056-60.

Minnikin DE, Minnikin SM, Parlett JH, Goodfellow M, Magnusson M. **Mycolic acid patterns of some species of *Mycobacterium*.** Arch.Microbiol. 1984;139(2-3):225-31.

Minnikin DE, Parlett JH, Magnusson M, Ridell M, Lind A. **Mycolic acid patterns of representatives of *Mycobacterium bovis* BCG.** J.Gen.Microbiol. 1984;130(10):2733-6.

Murray A, Winter N, Lagranderie M, et al. **Expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses.** Mol.Microbiol. 1992;6(22):3331-42.

Nascimento IP, Dias WO, Mazzantini RP, et al. **Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice.** Infect.Immun. 2000;68(9):4877-83.

O'Donnell MA. **The genetic reconstruction of BCG as a new immunotherapeutic tool.** Trends Biotechnol. 1997;15(12):512-7.

Ogra PL, Faden H, Welliver RC. **Vaccination strategies for mucosal immune responses.** Clin.Microbiol.Rev. 2001;14(2):430-45.

Ohara N, Yamada T. **Recombinant BCG vaccines.** Vaccine 2001;19(30):4089-98.

Philipp WJ, Schwartz DC, Telenti A, Cole ST. ***Mycobacterial genome structure.*** Electrophoresis 1998;19(4):573-6.

Radford AJ, Hodgson AL. **Construction and characterization of a *Mycobacterium-Escherichia coli* shuttle vector.** Plasmid 1991;25(2):149-53.

Roche PW, Triccas JA, Winter N. **BCG vaccination against tuberculosis: past disappointments and future hopes.** Trends Microbiol. 1995;3(10):397-401.

Seixas, F K. **CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE VACINAS RECOMBINANTES CONTRA LEPTOSPIROSE.** 2004. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola).Centro de Biotecnologia-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

Shmuel, R., Yogev, D., Naot, Y. **Molecular Biology and Patogenicity of Mycoplasmas**. Microb. And Molecular Reviews. 1998; 62 (4):1094-156.

Snapper CM, Hornbeck PV, Atasoy U, Pereira GM, Paul WE. **Interleukin 4 induces membrane Thy-1 expression on normal murine B cells**. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1988;85(16):6107-11.

Sobestiansky, J., Costa, O.A.D., Mores, N.. **Estudos ecopatológicos das doenças respiratórias dos suínos: Prevalência e impacto econômico em sistemas de produção dos estados de SC, RS e PR**. EMBRAPA-CNPISA, 2001. 6p. (EMBRAPA-CNPISA. Comunicado Técnico 287).

Stover CK, de IC, V, Fuerst TR, et al. **New use of BCG for recombinant vaccines**. Nature 1991;351(6326):456-60.

Straw BE, Tuovinen VK, Bigras-Poulin M. **Estimation of the cost of pneumonia in swine herds**. J.Am.Vet.Med.Assoc. 1989;195(12):1702-6.

Timm J, Perilli MG, Duez C . **Transcription and expression analysis, using lacZ and phoA gene fusions, of *Mycobacterium fortuitum* beta-lactamase genes cloned from a natural isolate and a high-level beta-lactamase producer**. Mol.Microbiol. 1994;12(3):491-504.

Winter N, Lagranderie M, Rauzier J, et al. **Expression of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein**. Gene 1991;109(1):47-54.

Winter N, Lagranderie M, Gangloff S, Leclerc C, Gheorghiu M, Gicquel B. **Recombinant BCG strains expressing the SIVmac251nef gene induce proliferative and CTL responses against nef synthetic peptides in mice**. Vaccine 1995;13(5):471-8.

www.pfizer-ahg.com.br/sui_Estudos1.asp. **Atualização de conceitos sobre *Mycoplasma hyopneumoniae* e resultado de vacinação com respisure® no Brasil**. Acessado em: 27/02/2005.

Zhang Q, Young TF, Ross RF. **Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells**. Infect.Immun. 1994;62(10):4367-73.

Zhang Q, Young TF, Ross RF. **Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin**. Infect.Immun. 1995;63(3):1013-9.