UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

Bacterinas de *Escherichia coli* recombinante: aspectos de biossegurança relacionados à resistência contra canamicina

Rafael Amaral Donassolo

Pelotas, 2018

Rafael Amaral Donassolo

‘‘Bacterinas de *Escherichia coli* recombinante: Aspectos de biossegurança relacionados à resistência contra canamicina’’

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição
Orientador de estágio: MSc. Marcos Roberto Alves Ferreira

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D674 Donassolo, Rafael Amaral

Bacterinas de *Escherichia coli* recombinante : aspectos de biossegurança relacionados à resistência contra canamicina / Rafael Amaral Donassolo ; Fabricio Rochedo conceição, orientador ; Marcos Roberto Alves Ferreira, coorientador. — Pelotas, 2018.

53 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Vacinas recombinantes. 2. Bacterinas. 3. Formaldeído. I. conceição, Fabricio Rochedo, orient. II. Ferreira, Marcos Roberto Alves, coorient. III. Título.

CDD : 615.372

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/90

Rafael Amaral Donassolo

Bacterinas de *Escherichia coli* recombinante: Aspectos de biossegurança relacionados à resistência contra canamicina

Trabalho de Conclusão aprovado, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 28/11/2018

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição (Presidente da Banca)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Profª. Dra. Sibele Borsuk
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Profª. Dra. Thaís Larré Oliveira
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho aos meus pais e amigos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por toda espiritualidade, fé e força para conseguir alcançar meus objetivos.

Aos meus amados pais, Celso e Fátima, agradeço por terem sido os melhores pais que eu poderia ter, pelo grandioso amor, pela confiança que sempre me depositaram para ir atrás dos meus sonhos, e por todo apoio fraternal que tenho recebido.

Aos meus novos e velhos amigos por quem tenho um amor enorme e levo todos no coração, independentemente de estarem perto ou distante. Obrigado pelos momento de alegria, de comemorações e distrações indispensáveis nesta caminhada.

Ao professor Fabricio, por ter me aceitado no laboratório desde o início e ter me motivado a ver a ciência de um modo encantador. Obrigado por ter compartilhado seus conhecimentos e me mostrado o melhor lado da biotecnologia.

Ao meu querido tutor, Marcos, por todo apoio, motivação, e principalmente paciência por ter me ensinado como trabalhar e me comportar no laboratório. Agradeço também por ser essa pessoa incrível, que me fez aprender a confiar em mim mesmo e nunca deixar eu triste depois de uma PCR mal sucedida.

Aos demais colegas do laboratório de imunologia aplicada, pelo companheirismo de sempre e ter tornado este, um ambiente prazeroso de se conviver. Destacando sempre Morgana, Emili, Paula, Clóvis, Lucas, Mariliana, Marina, Jaqueline, Rafael, Carol, Giana, Giuli, Igor e Fernanda.

Ao Fernando que vem me proporcionando momentos de muita alegria, companheirismo e apoio. Obrigado por ter entrado na minha vida e fazer dela ainda melhor.

E, finalmente a toda família Biotec por todos os momentos de grandes conhecimentos, descobertas, alegrias e parcerias que têm me proporcionado.

Muito obrigado.

‘’Pedras no caminho? Eu guardo todas, um dia vou construir um castelo.’’

Nemo Nox

Resumo

DONASSOLO, Rafael Amaral. **Bacterinas de *Escherichia coli* recombinante: aspectos de biossegurança relacionados à resistência contra canamicina.** 2018. 53f. Trabalho de conclusão de curso, curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2018.

Estudos recentes demonstraram que bacterinas de *Escherichia coli* recombinante expressando antígenos de *Clostridium* sp. induziram imunidade robusta em animais vacinados. Comparado aos toxóides convencionais utilizados rotineiramente no controle das clostridioses veterinárias, o processo de produção destas bacterinas é mais simples, seguro e rápido. Entretanto, tais bacterinas possuem um plasmídeo de expressão contendo um marcador de seleção que confere resistência ao antibiótico canamicina, o qual poderia ser dispersado e transferido acidentalmente para microrganismos no ambiente. Neste estudo, foram avaliadas diferentes concentrações (0,2%; 0,4% e 0,8%) de formaldeído quanto a sua eficácia como agente inativador de *Escherichia coli* recombinante e do gene de resistência a canamicina (*kan*R). A concentração de 0,8% inativou alta densidade de células ($2x10^8$, $2x10^9$, $2x10^{10}$) em 24 h. Para evitar a amplificação do *kan*R por PCR, foram necessárias 24 h de inativação com 0,8% ou 48 h com 0,4% de formaldeído. *Escherichia coli* DH5α competente foi incapaz, mediante eletroporação, de assimilar o DNA extraído das bacterinas recombinantes inativadas com 0,4 ou 0,8% de formaldeído por 48 h. Para testar a possibilidade de transferência gênica horizontal, alíquotas de bacterinas recombinantes foram co-cultivadas em agitador orbital com cepas viáveis de *E. coli* e foi constatado que não houve recombinação. Estes resultados demonstram a eficácia do formaldeído como um inativador e a segurança das bacterinas de *Escherichia coli* recombinante quanto à possibilidade de transferência do gene de resistência a canamicina.

Palavras-chave: vacinas recombinantes; formaldeído; bacterinas.

Abstract

DONASSOLO, Rafael Amaral. **Recombinant *Escherichia coli* bacterin: biosafety aspects related to the resistance against kanamycin.** 2018. 53f. Trabalho de conclusão de curso, curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2018.

Recent works from our group have described the successful use of inactivated recombinant *E. coli* to induce protection against *Clostridium* spp. in vaccinated animals. These bacterins are attractive due to their simplified production process, which shows to be safer and faster compared to that from the conventional toxoid vaccines. However, these bacterins carry expression plasmids that contain a gene for kanamycin resistance (*kanR*), which could theoretically be transferred to environmental microorganisms in case of accidents. Considering this, the present study evaluated different concentrations of formaldehyde (0.2, 0.4, and 0.8%) regarding its ability of inactivating *E. coli*, and the possible presence of the kanamycin resistance gene (*kanR*) in the resulting cells. The concentration of 0.8% was able to inactivate a high density ($2x10^8$, $2x10^9$, $2x10^{10}$) of cells in 24h. While the impairment of *kanR* amplification via PCR was achieved using either 0.8% for 24h, or 0.4% for 48h. In addition, *E. coli* DH5α was unable of acquiring the extracted plasmids from the inactivation procedures with 0.4 or 0.8% for 48 h via electroporation. To test the possibility of horizontal gene transfer of *kanR*, the inactivated recombinant *E. coli* was co-incubated with other viable strains of *E. coli*, leading to no detectable gene transfer. These results show the efficacy of formaldehyde as an inactivation agent and, more importantly, the safety of *Escherichia coli* bacterins regarding the possible kanamycin resistance gene transfer after inactivation.

Keyworld: recombinant vaccines; formaldehyde; bacterins.

Lista de Figuras

Figura 1 Representação esquemática dos tipos de vacinas de primeira geração..... 21

Figura 2 Estrutura geral de um virosssomo. Os principais constituintes de um virossomo são os fosfolipídios (fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina) e glicoproteínas (neuramidase e hemaglutinina)..... 28

Lista de Tabelas

Tabela 1 Inativação de *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star/pLIA/HcC (2×10^8, 2×10^9 e 2×10^{10} UFC/mL) com formaldeído 0.2, 0.4 e 0.8%(v/v)..... 39

Tabela 2 Amplificação do cassete do gene *kan*R através de PCR e de um fragmento de *kan*R por Nested PCR (nPCR)..... 40

Tabela 3 Crescimento de *Escherichia coli* DH5α transformada com DNA plasmidial extraído das bacterinas recombinantes..... 40

Tabela 4 Crescimento de cepas de *Escherichia coli* DH5α, Top10 e BL21 (DE3) PlysS em meio com antibiótico após co-cultivo com bacterinas recombinante..... 41

Lista de Abreviaturas e Siglas

APCs	Antigen Presenting Cells (Células Apresentadoras de Antígenos)
BoNTs	*Botulinum* neurotoxins (Neurotoxinas Botulínicas)
BCG	Bacilo Cálmete- Guerín
CNBS	Conselho Nacional de Biossegurança
CTNBIO	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
E. coli	*Escherichia coli*
F’	Fator de fertilidade
FeLV	Feline Leukimia Virus (Vírus da Leucemia Felina)
HPV	Human Papiloma Virus (Papiloma Vírus Humano)
IFN 1	Interferon tipo I
IPTG	Isopropil β-D-1 Thiogalactopiranosídeo
KanR	Gene de Resistência a canamicina
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MGMs	Microrganismos Geneticamente Modificados
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexo de Histocompatibilidade Principal)
OGMs	Organismos Geneticamente Modificados
OMS	Organização Mundial da Saúde
*ori*T	Origem de Transferência
PBS	Phosphate buffered Saline (Tampão Salino Tamponado com Fosfato)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

RPM	Rotações por Minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
TGH	Transferência Gênica Horizontal

Sumário

1.Introdução 14
2. Objetivos 16
2.1.Objetivo Geral 16
2.2 Objetivos Específicos 16
3 Revisão de Literatura 17
3.1 Histórico das Vacinas 17
3.2 Conceito 18
3.3 Tipos de Vacinas 19
3.3.1 Vacinas de primeira geração 19
3.3.1.1 Vacinas inativadas 19
3.3.1.2 Vacinas atenuadas 20
3.3.2 Vacinas de segunda geração 21
3.3.2.1 Vacinas de subunidades 22
3.3.2.2 Vacinas conjugadas 23
3.3.2.3 Vacinas recombinantes 23
3.3.2.4 Vacinas recombinantes vetorizadas 25
3.3.3 Vacinas de terceira geração (Vacinas de DNA) 26
3.3.4 Virossomos 27
3.3.5 Bacterinas recombinantes 28
3.3.6 Marcadores de seleção por resistência a antibióticos 29
3.3.7 Transferência gênica horizontal 30
3.3.8 Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados 31
3.3.9 Lei de Biossegurança 11.105/05 32
4 Artigo 35
5 Conclusão Geral 47
Referências 48

1. Introdução

Desde o surgimento da tecnologia do DNA recombinante nos anos 70, diferentes sistemas de expressão de proteínas heterólogas têm ganhado destaque na produção de proteínas, como células de mamíferos, insetos, plantas, fungos e microrganismos (CLARK e CASSIDY-HANLEY, 2005). *Escherichia coli* tem sido o microrganismo destaque neste sistema, uma vez que é a pioneira nos estudos de engenharia genética, pois apresenta manipulação genética simplificada, existência de inúmeras cepas, diversos vetores para clonagem e expressão e processos fermentativos bem adaptados (HUANG *et al*., 2012; MOREIRA *et al* ., 2014). Dentre as vantagens do uso de *E. coli* para a indústria podemos citar o crescimento rápido, alta produção das proteínas, facilidade de *scale-up* e meios de cultura baratos (HUANG *et al*., 2012).

Antígenos purificados produzidos a partir de *Escherichia coli* recombinante são uma nova ferramenta na produção de vacinas veterinárias. Estas se sobressaem às vacinas de primeira geração compostas de toxinas inativadas que necessitam cultivo e seleção de melhores estirpes, além de purificação e detoxificação das toxinas, o que torna o processo de produção extremamente laborioso e de alto risco biológico (HJERPE, 1990). A produção de *E. coli* recombinante inativada (bacterina recombinante) tem se mostrado um processo favorável em relação as vacinas de segunda geração pois dispensam as etapas de purificação das proteínas recombinantes, aumentam a resposta imunológica pela utilização de adjuvantes de baixo custo (LPS), e diminuem os custos de produção destas vacinas (MOREIRA JR *et al*., 2016; MOREIRA JR *et al*., 2018; FERREIRA *et al*., 2018).

Estudos recentes utilizando bacterinas recombinantes inativadas expressando diversos antígenos de *Clostridium* sp. na imunização de animais foram capazes de induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes (MOREIRA JR *et al*., 2016; MOREIRA JR *et al*., 2018; FERREIRA *et al*., 2018). Entretanto, antígenos recombinantes não purificados oriundos de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) podem conter um gene de resistência à antibiótico, presente no vetor de expressão (PRAKASH, 2011). Havendo o risco de dispersão no

ambiente em caso de acidentes, possibilidade de interação com outras espécies e transferência gênica horizontal do transgene destes OGMs, estudos relacionados à biossegurança devem ser conduzidos (FRIEDRICH e PASSAGLIA, 2004; KEESE, 2008; PRAKASH, 2011).

A inativação química por formaldeído tem sido utilizada em processos de detoxificação na indústria farmacêutica. Este atua modificando a conformação das proteínas sem destruir os sítios imunogênicos das mesmas (ANDERSEN *et al*., 2007). Já no DNA, é sabido que o formaldeído atua provocando mudanças conformacionais na dupla fita, no entanto seu mecanismo ainda não é bem elucidado (HOFFMAN, *et al*., 2015). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do formaldeído em inativar o gene de resistência a canamicina (*kan*R) contido no vetor pLIA/H_cC presente na bacterina de *E. coli* recombinante.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência do formaldeído em inativar o gene de resistência a canamicina (*kan*R) contido no vetor pLIA/H_cC presente na bacterina de *E. coli* recombinante.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a inativação de cultivos de *E. coli* BL21 DE3 Star com diferentes densidades celulares;

Avaliar a transformação de *E. coli* DH5α eletrocompente com DNA extraído da bacterina recombinante;

Avaliar a amplificação do gene *kan*R por PCR a partir do DNA extraído da bacterina recombinante;

Avaliar a capacidade de recombinação da bacterina recombinante com cepas de *E. coli*.

3. Revisão de Literatura

3.1 Histórico das Vacinas

Os primeiros registros da prática de imunização datam dos séculos XII e XV em civilizações provenientes da China e Oriente Médio num processo chamado variolação (HILLEMAN, 2000). Este processo se dava com a inoculação de pústulas de varíola de indivíduos doentes em sadios objetivando proteção contra uma futura exposição ao vírus, no entanto, esta prática apresentava alto risco de contrair esta doença pela utilização do patógeno e pela possibilidade de contágio com doenças transmissíveis por sangue contaminado (RIEDEL, 2005; JIVANI *et al*., 2016).

Edward Jenner foi o pioneiro a conduzir investigações científicas acerca da variolação e comprovou que pessoas inoculadas com o vírus da varíola bovina desenvolviam imunidade contra a versão humana da doença, este experimento desencadeou diversos estudos nas áreas de vacinologia e imunologia (HILLEMAN, 2000; LAHARIYA, 2014). Outros cientistas como Louis Pasteur, Robert Koch e Emil von Behring, motivados pelas descobertas realizadas por Jenner, causaram uma revolução na vacinologia no final do século XIX (LOMBARD *et al*., 2007; DOHERTY e ANDERSEN, 2005; BERCHE, 2012).

Pasteur foi responsável pelo uso de ovos embrionados, tecidos de animais assim como agentes físicos e químicos para atenuação e inativação de patógenos e suas toxinas (MCVEY e SHI, 2010). Através destas metodologias um grande número de vacinas foi desenvolvido principalmente, contra a raiva, coqueluche, difteria, tuberculose e tétano (MCVEY e SHI, 2010). Os anos 50 foram marcados pelo apoio de órgãos públicos e fundações como a Organização Mundial da Saúde (OMS), com isso novas vacinas foram desenvolvidas dando destaque a vacinas contra a Pólio e Influenza (HILLEMAN, 2000; TAHAMTAN *et al*., 2017).

Ao longo dos anos o uso de vacinas trouxe consideráveis avanços na medicina preventiva diminuindo a incidência e transmissão de doenças que historicamente devastavam civilizações. Dados indicam que a utilização de vacinas podem prevenir 25 milhões de mortes entre 2011 e 2020 (TAHAMTAN *et al*., 2016). Como consequência da prática da vacinação no mundo todo, doenças como a varíola e poliomielite foram erradicadas (STRASSBURG, 1982; EHRETH, 2003; BHAUMIK, 2012). Atualmente vacinas contra muitas doenças vem sendo desenvolvidas e distribuídas para a população, diminuindo a transmissão e infecção por diversas doenças. Além disso, novos estudos vêm sendo realizados através da utilização de técnicas modernas de biotecnologia visando a otimização e inovação no processo de produção de vacinas, desencadeando maior produção, eficácia e segurança.

3.2 Conceito

Vacinas podem ser definidas como uma preparação biológica que contém um ou mais agentes capazes de induzir uma resposta imune em um determinado hospedeiro (ABBAS, 2015). Vacinas são mais vantajosas em relação ao uso de fármacos uma vez que evitam o desencadeamento de doenças, protegem de forma prolongada, diminuem a ocorrência da resistência a antimicrobianos e custam menos do que o tratamento das doenças (NAGIL e KAUR, 2011).

A forma mais comum de medir a eficácia de uma vacina é a resposta humoral, no entanto, para uma resposta imune ideal é necessário a ativação tanto da imunidade humoral quando da imunidade celular. A principal função da resposta imune humoral é a produção de anticorpos, que devem ser capazes de neutralizar, opsonizar e ativar o sistema complemento auxiliando a eliminação do patógeno (MURPHY *et al*., 2010). Para uma completa ativação da resposta humoral é necessário a ativação de células do sistema imune celular como linfócitos B e T, células apresentadoras de antígenos e células fagocíticas assim como maturação, expansão e diferenciação destas células que desencadearão uma memória imunológica protegendo o individuo de futuras infecções,

evidenciando a importância do equilíbrio e ativação destas diferentes vias (MCVEY e SHI, 2010).

Além de gerar uma resposta imune eficaz uma vacina deve atender a diferentes requisitos para ser considerada uma vacina ideal como gerar máxima segurança ao paciente, manipulador e ao meio ambiente; ser inoculada em dose mínima; apresentar resposta imune de longa duração; gerar proteção de amplo espectro ao patógeno; apresentar estabilidade, fácil administração, baixo custo e fácil produção industrial (COLER e REED, 2005; PINTO *et al.,* 2011).

3.3 Tipos de Vacinas:

3.3.1 Vacinas de Primeira Geração

Vacinas de primeira geração foram os primeiros tipos de vacinas desenvolvidas, sua metodologia baseia-se na inativação ou na atenuação de microrganismos (PLOTKIN, 2014). A principal vantagem deste método é a forte estimulação do sistema imune, memória imunológica de longo prazo, fácil produção e baixo custo. No entanto, nem sempre é recomendada a utilização dessas vacinas uma vez que estes patógenos possuem a capacidade de reverter a virulência causando danos ao hospedeiro (ARNON e YEDIDIA, 2003; HUANG *et al*., 2004). Vacinas desta geração podem ser divididas em dois subgrupos: as vacinas inativadas e as atenuadas (Figura 1).

3.3.1.1 Vacinas inativadas

Estas vacinas são compostas por microrganismos inteiros que passam por processos de inativação física (calor, radiação) e/ou químicos (formaldeído, acetona, etanol, betapropiolactona, etilamina, formalina e fenol) com o objetivo de diminuir sua virulência (PLOTKIN, 2014; TAHAMTAN *et al*., 2017). Uma vez inativados estes patógenos perdem a capacidade de multiplicar-se, porém mantem suas estruturas, essenciais para geração de uma resposta imune (BRAZ *et al* 2014). Essas vacinas são consideradas seguras, no entanto, por

apresentarem baixa eficácia necessitam a utilização de várias doses (GASPAR e SANTOS, 2014). Para aumentar a efetividade são requeridas altas doses de antígenos associados à adjuvantes, que encarecem a produção destas vacinas (AZEVEDO, 2002; CANAL e VAZ, 2012). Durante a inativação, uma outra desvantagem destas formulações é a dificuldade em inativar uniformemente os lotes, trazendo risco de infecção nos indivíduos vacinados, além disso, calor e radiação podem diminuir a antigenicidade destas vacinas (GASPAR e SANTOS, 2014).

O processo de produção da vacina antirrábica é característico de vacinas inativadas, o *Rhabdovirus* causador da doença é cultivado em células VERO e em seguida inativado pela beta propiolactona. Outro exemplo é a vacina Salk, que protege contra a paralisia infantil. Sua formulação possui três tipos de poliovírus: 1, 2 e 3 que são cultivados em células VERO e posteriormente inativados com formaldeído.

3.1.1.2 Vacinas atenuadas

Neste tipo de imunização o agente infeccioso tem sua virulência reduzida, porém mantem seu caráter imunogênico e induz uma potente resposta imune humoral e celular (CLEM, 2011). Mesmo atenuado, o patógeno pode replicar-se no hospedeiro porém apresenta pouca capacidade de disseminação (GASPAR e SANTOS, 2014). O processo de atenuação que acarreta diminuição da patogenicidade é resultado de diferentes técnicas produzidas *in vitro* como cultura em ovos embrionados e sucessivas passagens em cultivos celulares ou em meios de cultivo (BRAZ *et al* 2014). Essas formas de cultivo não representam o ambiente natural do microrganismo, o que causa perda seletiva da expressão de genes, consequentemente acarretam a diminuição da virulência ao longo do tempo (BALESTIERI, 2006).

As principais vantagens são a imunidade duradoura e alta eficácia, no entanto estes microrganismos podem reverter a virulência, podendo causar doença (LAURING et al., 2010). Em outros casos, quando a atenuação é incompleta pode-se apresentar reações indesejáveis após a administração,

sendo muitas delas graves em indivíduos debilitados (GASPAR e SANTOS, 2014). Outra desvantagem destas vacinas é a dificuldade de transporte e armazenamento uma vez que necessitam de temperatura adequada para evitar deterioração (SCHATZMAYR, 2003).

A vacina tetra viral que protege contra quatro tipos de vírus que causam sarampo, rubéola, caxumba e varicela é um exemplo de vacina atenuada. O processo de produção se dá pela atenuação dos vírus através de cultura de células de ovos de galinha embrionados. A vacina contra a febre amarela e gripe também são produzidas de forma semelhante.

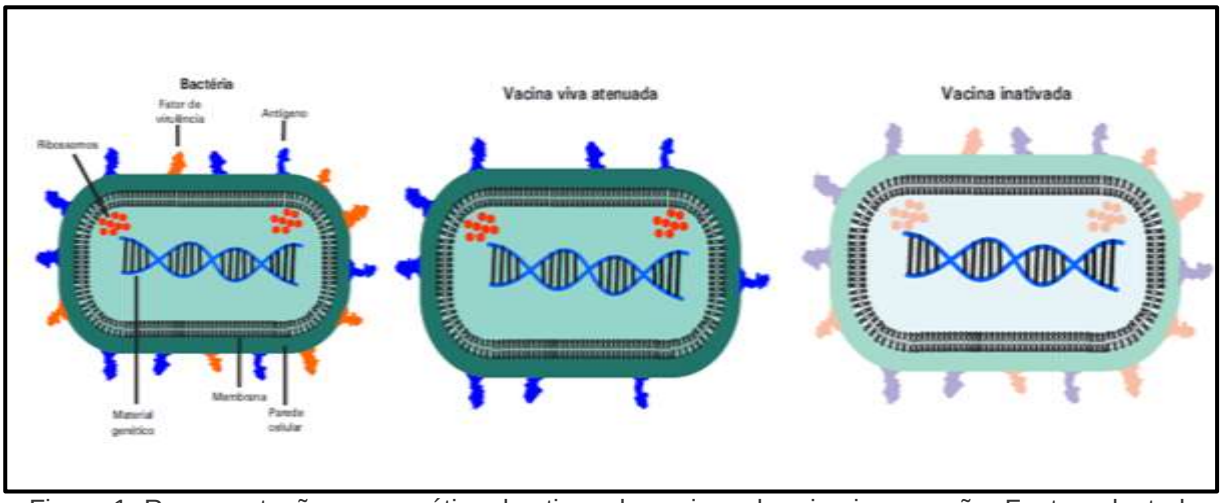

Figura 1. Representação esquemática dos tipos de vacinas de primeira geração. Fonte: adaptado de GASPAR e SANTOS, 2014, p.15.

3.3.2 Vacinas de Segunda Geração

Vacinas de primeira geração apresentam tendência de reverter a virulência gerando assim um potencial risco a saúde dos hospedeiros, além disso, o processo de produção destas vacinas é laborioso e de alto risco biológico (CHEN *et al.,* 1994; PLOTKIN, 2009). Visando superar essas desvantagens foram criadas as vacinas de segunda geração. Essa proposta inovadora baseia-se na ideia de que para alguns patógenos a resposta imune pode ser gerada por pequenas partes-alvo deste patógeno (DINIZ e FERREIRA, 2010). Inicialmente, essas vacinas se limitavam a utilização de toxinas inativadas ou polissacarídeos

purificados, no entanto a obtenção destes imunógenos era dificultada e bastante restrita (DINIZ e FERREIRA, 2010; BRAZ *et al* 2014). As maiores inovações nesta área foram desencadeadas pelo desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante assim como pelo aperfeiçoamento da biotecnologia que foram cruciais para a eficiência e a otimização do processo de produção desses antígenos (CLARK e CASSIDY-HANLEY, 2005). As vacinas deste grupo podem ser distribuídas em três diferentes subgrupos: as vacinas de subunidade, as conjugadas e as recombinantes.

3.3.2.1 Vacinas de subunidade

Ao invés do uso do patógeno inteiro para estimular o sistema imune, as vacinas de subunidade propõem o uso de pequenas partículas destes organismos que são suficientes para gerar uma resposta imune (DUDEK *et al*., 2010). Essas estruturas geralmente são peptídeos, proteínas ou polissacarídeos, sendo as toxinas as principais representantes dessa classe (DUDEK *et al*., 2010; TAHAMTAN *et al*., 2017). As toxinas produzidas pelos microrganismos sofrem um processo de inativação, geralmente por formaldeído, e quando administradas geram anticorpos neutralizantes impedindo a infecção no hospedeiro (MCVEY e SHI, 2010). Essas vacinas são amplamente utilizadas uma vez que induzem elevada resposta imune e são incapazes de replicar-se no hospedeiro (TAHAMTAN *et al*., 2017). A principal desvantagem do uso destas subunidades é em relação a produção, as etapas de purificação e a necessidade de grandes quantidades de imunógenos associada com a necessidade de administração de diversas doses, tornam o custo elevado (GASPAR e SANTOS, 2014; JIVANI *et al*., 2016).

A vacina dT responsável pela proteção contra tétano e difteria é produzida a partir das toxinas inativadas (toxóides) de *Clostridium tetani* e *Corynebacterium diphtheriae* sendo então representantes deste grupo. Para animais, um exemplo desta classe é a vacina utilizada para prevenção do botulismo, na qual é composta pelas toxinas botulínicas C e D inativadas com formaldeído.

3.3.2.2 Vacinas conjugadas

Vacinas conjugadas foram criadas especialmente para doenças causadas por bactérias encapsuladas. Estas bactérias possuem uma cápsula polissacarídica que torna difícil o reconhecimento pelas células apresentadoras de antígenos assim como o processamento pelo sistema imune, causando uma fraca produção de anticorpos (AVERY e GOBBEL, 1929; BAKER, 1992). Para facilitar o reconhecimento destes microrganismos pelos leucócitos essa cápsula é conjugada com proteínas carreadoras como o toxóide tetânico, as quais são mais facilmente processadas e induzem uma forte resposta imune com memória imunológica prolongada (SÁFADI e BARROS, 2006).

Um exemplo de vacinas conjugadas é a VPC10 que previne contra a pneumonia e meningite, esta é composta de dez sorotipos de *Streptococcus pneumoniae.* Oito deles são conjugados com a proteína D de *Haemophilus influenzae* tipo B, um com o toxoide tetânico e outro com toxoide diftérico.

3.3.2.3 Vacinas Recombinantes

Com os avanços na área de biologia molecular assim como da engenharia genética foi possível que o material genético de um organismo fosse transferido para outro. Através dessa inserção o gene exógeno é capaz de recombinar-se no hospedeiro e ser traduzido em uma proteína. A produção dessas vacinas se da pela clonagem de várias cópias de um gene (gerado principalmente por reação em cadeia da polimerase (PCR) em um vetor de expressão. Essa inserção, em geral, acontece com auxílio de enzimas de restrição que clivam extremidades coesivas do gene e do vetor, tornando possível a ligação através da enzima de ligação. Após a ligação este vetor é inserido em uma célula hospedeira que podem ser plantas, bactérias, leveduras, insetos e até animais. *Escherichia coli* é o principal sistema de expressão utilizado, pois apresenta rápido crescimento o que facilita o escalonamento, necessita de meios de cultivo

baratos, fisiologia e genética são bem conhecidas, apresenta fácil manipulação e alta produção de proteínas (VINCENTELLI e ROMIER, 2013; ROSANO e CECCARELLI, 2014).

O uso da tecnologia do DNA recombinante para produção de antígenos vacinais foi recentemente favorecido pelo aperfeiçoamento da bioinformática e do sequenciamento de DNA tornando possível a predição *in silico* de genes racionalmente mais imunogênicos, fenômeno conhecido como vacinologia reversa (RAPPUOLI, 2001; PLOTKIN, 2009). Esses avanços tornaram esta metodologia mais favorável em relação às vacinas tradicionais principalmente em relação a segurança. Antígenos recombinantes anulam a possibilidade de reversão da virulência, diminuindo a toxicidade ao hospedeiro e o processo de produção apresenta alta segurança biológica, minimizando os riscos aos operadores (MOREIRA *et al*., 2016; MOREIRA JR *et al*., 2016; MOREIRA JR *et al*., 2018).

Embora a produção de proteínas recombinantes apresente grande potencial pela sua segurança e reprodutibilidade, as proteínas expressas nesse tipo de sistema necessitam de vários processos de extração, solubilização e purificação, sendo as principais desvantagens para produção industrial (MOREIRA *et al*., 2014). Recentemente, duas vacinas recombinantes foram aprovadas para uso em humanos. Uma delas a Bexsero™ protege contra a bactéria *Neisseria meningitidis* causadora de meningite e sepse. A vacina é composta por diferentes antígenos deste patógeno que foram produzidos de forma recombinante em *E. coli.* Já a GARDASIL® é utilizada para prevenção contra o Papiloma Vírus Humano (HPV), sua formulação é composta por proteínas (L1) localizadas no capsídeo do vírus e produzidas por sistema heterólogo utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae.*

Em animais, um exemplo de vacina recombinante utilizada é a LEISH TEC®, esta é composta pelo antígeno A2-HIS de *Leishmania* sp. produzido em *E. coli.* Esta proteína gera uma resposta imune contra diversas espécies de *Leishmania* sp. agente causador de leishmaniose visceral canina.

3.3.2.4 Vacinas recombinantes vetorizadas

Vacinas vetorizadas são geralmente compostas de vírus que sofreram processo de atenuação através do silenciamento de genes responsáveis pela virulência, sendo assim incapazes de causarem doença, porém viáveis para replicação (BRAZ *et al* 2014). Por meio de modificações genéticas estes vírus foram construídos para transportar genes codificadores de determinantes antigênicos de diferentes patógenos que uma vez inoculados, são capazes de expressarem os antígenos (SCARSELLI, 2015).

O uso de vetores virais induz uma potente e rápida ativação do sistema imune, principalmente pela ativação de Interferon tipo I (IFN I) que provoca indução de linfócitos T e facilita o processamento e apresentação pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (TOVEY et al., 2008; SCARSELLI, 2015). As famílias *Adenoviridae, Poxviridae* e *Rhabdoviridae* são os mais utilizadas como vetores, uma vez que apresentam facilidade de clonagem e expressão do transgene, transdução eficiente, forte tropismo pelo hospedeiro, capacidade de infectar diversas células e induzem ampla resposta imune (URA *et al*., 2014; SCARSELLI, 2015).

Além de vírus, algumas bactérias também são utilizadas como vetor como o *Mycobacterium bovis* Calmette- Guerin (BCG), *Salmonellae spp*, *Listeria monocytogenes* e *Shigellae spp* (NASCIMENTO e LEITE, 2012; DELANY *et al*., 2014). Além da eficiente resposta imune celular e humoral o uso destas bactérias ativam imunidade de mucosa, podendo ser administradas oralmente (ANDERSSON, 2000). Em casos de reações adversas, estas cepas são sensíveis a antibióticos sendo um fator favorável em relação a segurança (NASCIMENTO e LEITE, 2012).

Como desvantagens, a utilização de vírus e bactérias como vetores requer alto custo de produção pela utilização de meios e linhagens celulares caras, além disso, a integração do DNA no genoma do hospedeiro podem afetar oncogenes, e por fim pode haver pré-imunidade contra o vetor o que diminui a ativação do sistema imune, tornando a vacina ineficaz (URA *et al*., 2014).

A EURIFEL FeLV® (MERIAL) vacina contra o vírus da leucose felina (FeLV) por exemplo, é constituída de um vírus *Canaripox* recombinado incapaz

de replicar-se no hospedeiro. Este quando inoculado é capaz de expressar duas proteínas do FeLV (env e gag) gerando proteção eficiente contra os sub-grupos A, B e C causadores de leucemia felina. Outra formulação atualmente disponível é a RECOMBITEK® (MERIAL), composta pelo vetor recombinante da bouba de canário contendo os genes codificadores de duas proteínas (proteína de fusão e hemaglutinina) do vírus da cinomose canina, após a aplicação subcutânea no cão o vetor transcreve o DNA e expressa as proteínas que são reconhecidas pelas células do sistema imune tornando o animal imune à doença.

3.3.3 Vacinas de Terceira Geração (Vacinas de DNA)

A terceira geração de vacinas é caracterizada pela utilização de um plasmídeo contendo o DNA codificador do antígeno de interesse que é injetado no indivíduo (KALIL *et al*., 2008). No organismo do hospedeiro o antígeno é expresso, fragmentado e os peptídeos apresentados pelo MHC, desencadeando uma potente resposta celular e humoral (KALIL *et al*., 2008; HASSON *et al*., 2015). O plasmídeo eucariótico é fortemente controlado por um promotor viral, que permite transcrição pelas células de mamíferos e possui origem de replicação para *E.coli,* permitindo a propagação (ANDERSSON, 2000). Diferentes métodos de transfecção do DNA podem ser utilizados como: microinjeção no músculo esquelético; eletroporação; agregação em polímeros ou diretamente na mucosa (HASSON *et al*., 2015).

As vantagens da utilização desta abordagem são inúmeras: ausência do risco de replicação no organismo; possibilidade de utilização de diversos antígenos numa única vacina; fácil produção e baixo custo; geração de imunidade de longa duração e ativação de células T citotóxicas; material estável, entre outros (CABRERA *et al*., 2012; NASCIMENTO e LEITE, 2012; TAHAMTAN *et al*., 2017). Apesar das diversas vantagens, estas formulações apresentam grandes entraves que limitam sua produção. Vacinas de DNA apresentam problemas de segurança uma vez que podem ser incorporadas no genoma e ativarem oncogenes, induzem baixa imunogenicidade na ausência de adjuvantes; é restrita para antígenos proteicos, há a possibilidade de causarem doenças autoimunes e

ainda baixa taxa de transfecção e processamento (NASCIMENTO e LEITE, 2012; HASSON *et al*., 2015; TAHAMTAN *et al*., 2017)

Apesar dos avanços abrangendo esta metodologia poucas vacinas estão atualmente disponíveis no mercado. A WEST NILE-INNOVATOR® uma vacina que protege contra o vírus da febre do Nilo em equinos e a APEX®-IHN utilizada contra vírus da necrose hematopoiética em salmão são exemplos.

3.3.4 Virossomos

Virossomos são envelopes virais construídos artificialmente com o objetivo de serem usados como um sistema de entrega de antígenos vacinais (KALRA *et al*., 2013). Esses vírus são constituídos principalmente de envelope vazio do Influenza vírus (sem material genético), incapazes de replicação porém são capazes de liberarem as formulações dentro da célula-alvo, em sua constituição apresentam neuramidase, hemaglutinina e uma série de fosfolipídios aderidos à membrana que podem ser modificados conforme o alvo (Figura 2) (RATHORE *et al*., 2012; SINGH *et al*., 2017).

No organismo, as glicoproteínas do virossomo se aderem na membrana das células do hospedeiro e por endocitose é internalizado. O ambiente ácido do endossomo faz com que o fármaco seja liberado no citosol, neste local o virossoma protege o composto do pH baixo e da degradação proteolítica (KALRA *et al*., 2013). A hemaglutinina fornece efeito adjuvante, assim o antígeno é processado e apresentado às células apresentadoras de antígenos (APCs) via MHC II, desencadeando a produção de anticorpos via células B (RATHORE *et al*., 2012). Além disso, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) contidos no virossomo ativam fortemente os receptores de células T que estimulam as células de memória, amplificando a resposta imune (RATHORE *et al*., 2012; SINGH *et al*., 2017).

A utilização destas formulações apresentam-se vantajosas pois virossomos são biodegradáveis, não-tóxicos e biocompatíveis demonstrando alta segurança (IDRIS *et al*., 2014). Além disso, não fornecem risco de autoimunidade ou

transmissão de doenças, entregam o composto dentro da célula protegendo contra a degradação, e ativam uma ampla resposta imune (HUCKRIEDE *et al*., 2005; KALRA *et al*., 2013).

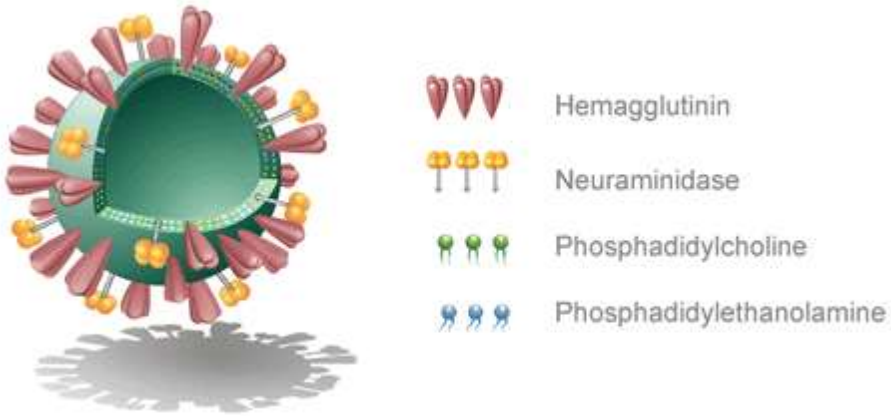

Figura 2: Estrutura geral de um virosssomo. Os principais constituintes de um virossomo são os fosfolipídios (fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina) e glicoproteínas (neuramidase e hemaglutinina). Fonte: SINGH et al., 2017, p.47.

3.3.5 Bacterinas Recombinantes

A produção de *E. coli* recombinante inativada com formaldeído (bacterina recombinante) surge como uma proposta para substituir as vacinas de primeira e segunda geração. Estudos recentes utilizando esta abordagem apresentaram resultados satisfatórios. Cobaios, búfalos, bovinos e ovinos vacinados com bacterinas compostas de diferentes toxinas de *Clostridium* spp. induziram imunidade protetora nesses animais (MOREIRA JR *et al*., 2016; MOREIRA JR *et al*., 2018; FERREIRA et al., 2018). O uso desta metodologia apresenta inúmeras vantagens como baixa toxicidade ao hospedeiro, dispensa processos de purificação e solubilização, inativação rápida, baixo risco biológico e menor custo quando comparadas às vacinas purificadas.

Entretanto, uma desvantagem deste sistema é que antígenos recombinantes não purificados, oriundos de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) inativados, possuem gene de resistência a antibiótico presente no plasmídeo de expressão o que pode ser um empecilho na liberação

destas formulações para comercialização uma vez que a dispersão destes genes no ecossistema podem causar distúrbios ambientais.

3.3.6 Marcadores de seleção por resistência a antibióticos

A identificação de organismos transgênicos é dada principalmente pela utilização de marcadores de seleção os quais permitem o desenvolvimento apenas do organismo modificado. Em microrganismos esses marcadores são compostos por seleção auxotrófica de algum metabólito ou são atribuídos genes que garantem resistência a algum antibiótico, o que representa a maioria desses marcadores (FREY, 2007).

São inúmeros os antibióticos utilizados para esta abordagem, sendo os principais ampicilina, canamicina, gentamicina, higromicina, entre outros (MIKI e McHUGH, 2004). A canamicina por exemplo, um dos antibióticos predominantes, pertence a classe dos aminoglicosídeos e é utilizado na medicina humana e animal (WILLIAMS, 2013; SOWAJASSATAKUL *et al*., 2018). Seu mecanismo de ação é a inibição da síntese proteica das células microbianas, os organismos contendo o marcador de seleção (*Npt* II ou *kan*R) tornam-se resistentes uma vez que codificam enzimas capazes de degradar esse fármaco por fosforilação (BEVAN *et al*., 1983; MIKI e McHUGH, 2004).

O risco de dissipação de genes de resistência a antibióticos no ambiente e a possibilidade de transferência desses genes de um organismo para outro são as principais preocupações a serem consideradas em relação a produção e comercialização de OGMs (VANDERMEULEN *et al*., 2011; WILLIAMS, 2013). Embora haja diversos estudos demonstrando que a taxa de transferência destes genes para outros organismos seja muito baixa (NEILSEN *et al*., 1998; SMALLA *et al*., 2000; FRIEDRICH e PASSAGLIA, 2004) deve-se manter preocupação quanto a liberação destes OGMs.

3.3.7 Transferência gênica horizontal (TGH)

A habilidade de transferir genes de uma bactéria para outra é conhecida como transferência gênica horizontal (TGH) (WILBER, 2016). Este fenômeno foi primeiramente descoberto por Frederick Griffith em 1928 envolvendo cepas de *Streptococcus pneumoniae,* mais tarde descobriu-se que existiam três principais mecanismos de transferência: a conjugação, transformação e a transdução (KEESE, 2008; PRAKASH *et al*., 2011).

A transformação ocorre quando uma bactéria receptora adquire estado de competência e é capaz de captar DNA extracelular de outro organismo em determinado ambiente (YIN e STOTZKY, 1997). Para que o material genético seja incorporado no organismo são necessárias diferentes etapas que vão desde a liberação do DNA até a expressão do gene integrado (KEESE, 2008; YIN e STOTZKY, 1997). Em relação ao ecossistema, as etapas de dispersão e a persistência do DNA no ambiente são essenciais para ocorrência da transformação, contudo, nestes estágios o material genético pode ser rapidamente degradado por enzimas, além de outras adversidades do solo como temperatura, umidade, radiação, pH, fontes de energia, entre outros que dificultam este processo (STOTZKY, 1989).

A conjugação é o tipo de TGH onde é necessário o contato célula-a-célula de uma bactéria com outra para ocorrer a troca. Além disso, uma série de elementos são essenciais. Em bactérias Gram-negativas além de uma origem de transferência (oriT) (região do DNA que é clivado no momento da transferência) é necessário um fator de fertilidade (F') (YIN e STOTZKY, 1997). Os F' são um conjunto de genes responsáveis pela síntese de uma ponte (pili sexual) que irá conectar a bactéria doadora com a receptora possibilitando a transferência do DNA (HOWARD, *et al*, 1995).

Resumidamente, o processo de transferência por conjugação inicia com o contato entre as células pela ponte, prosseguindo com a formação de um poro entre o citoplasma das duas células (WILLETTS e WILKINS, 1984). Na célula doadora, um conjunto proteíco (relaxossoma) circunda a região do plasmídeo e uma das fitas do sítio *nicking* da oriT é clivado na região 5' por uma relaxase (FU *et al*., 1991; BYRD e MATSON, 1997). Seguidamente, a relaxase

movimenta-se na direção de 5' - 3' no plasmídeo separando a fita e formando um círculo na região oriT, o processo é finalizado quando esta enzima encontra a região terminadora, dissociando o DNA (BYRD e MATSON, 1997). A fita gerada é mobilizada pelo poro e então transferida para o citoplasma da bactéria receptora podendo ser replicada ou integrada no cromossomo (HOWARD *et al*., 1995). Assim como na transformação, a conjugação bacteriana conta com diversos fatores biológicos desfavoráveis o que impede seu êxito, como a degradação do DNA estranho por endonucleases da própria bactéria; estado fisiológico inativo de algumas bactérias; diminuição da sobrevivência em ambientes não estéreis; competição com outras populações; baixa densidade doador-receptor, além de diversos fatores abióticos já mencionados (WILKINS, 1990).

O terceiro tipo de TGH, a transdução, por sua vez, é um tipo de transferência gênica mediada por fagos, nesse caso uma bactéria recebe material genético de outra através de um vírus, denominado bacteriófago (ZINDER e LINDENBERG, 1952; YIN e STOTZKY, 1997).

3.3.8 Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados

Os crescentes avanços na área de biotecnologia moderna e engenharia genética tem contribuído satisfatoriamente no desenvolvimento de OGMs utilizados na agricultura, saúde e indústria, no entanto, vem aumentando a preocupação em relação ao fluxo gênico entre estes organismos principalmente relacionados à marcadores de seleção por resistência a antibióticos existente em sua constituição (VELKOV, 2001; COSTA e COSTA 2009). Buscando preservar a biodiversidade, a sustentatibilidade e a manutenção do ecossistema, a introdução destes genes exógenos no ambiente deve ser avaliada não só como potencial de gravidade mas também como a possibilidade de efeitos adversos, uma vez no ambiente esses genes podem desenvolver características indesejáveis e em alguns casos, danosas ao ecossistema (PRAKASH *et al*., 2011).

No ambiente, um OGM é capaz de se dispersar, colonizar e interagir com vários nichos biológicos o que evidencia a constante preocupação de órgãos de biossegurança em relação a liberação de OGMs e seus derivados.

3.3.9 Lei de Biossegurança 11.105/05

O princípio da precaução citado no artigo 10 e 11 do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança estabelece que “a ausência de certeza científica devida à insuficiência das informações e dos conhecimentos científicos relevantes sobre a dimensão dos efeitos adversos potenciais de um organismo vivo modificado na conservação e no uso sustentável da diversidade biológica na Parte importadora, levando também em conta os riscos para a saúde humana, não impedirá esta Parte, a fim de evitar ou minimizar esses efeitos adversos potenciais, de tomar uma decisão, conforme o caso, sobre a importação do organismo vivo modificado”.

Nesta perspectiva, foi criada em de 24 de março de 2005 a lei brasileira de biossegurança 11.105/05 a qual estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam OGMs e seus derivados. Além disso, esta lei cria dois órgãos nacionais, o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), e a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) com diferentes atribuições no âmbito da biossegurança.

Esta lei preceitua em seu art. 3º que “organismo geneticamente modificado - OGM: é um organismo cujo material genético – DNA/RNA tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética’’. Esta lei estabelece também em seu art. 6º que fica proibida a liberação no meio ambiente de OGM ou seus derivados, seja no âmbito de atividades de pesquisa, ou liberação comercial sem a decisão/parecer técnico favorável da CTNBio, ou sem o licenciamento do órgão ou entidade ambiental responsável quando a atividade é considerada como potencialmente causadora de degradação ambiental, ou sem a aprovação do CNBS, quando o processo tenha sido por ele avocado, na forma desta Lei e de sua regulamentação.

4 Manuscrito

Os dados gerados neste trabalho estão apresentados na forma de um artigo científico. O artigo apresenta a avaliação dos efeitos do formaldeído sobre bacterinas de *Escherichia coli* recombinante. Este trabalho está formatado de acordo com as normas do periódico Plos One (Fator de impacto: 2.8, Qualis A1 na área de Biotecnologia).

Recombinant *Escherichia coli* bacterin: biosafety aspects related to the resistance against kanamycin

Rafael Amaral Donassolo[1*], Marcos Roberto Alves Ferreira[1], Clovis Moreira Junior[1], Lucas Moreira dos Santos[1], Emili griep[1], Gustavo Marçal Schmidt Garcia Moreira[2], Angela Nunes Moreira[1], Fabricio Rochedo Conceição[1]

[1]Centro de Desenvolvimento Tecnológico-Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

[2]Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik, Abteilung Biotechnologie, Spielmannstr, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Germany.

*rafaeldonassolo@hotmail.com

Abstract

Recent works from our group have described the successful use of inactivated recombinant *E. coli* to induce protection against *Clostridium* spp. in vaccinated animals. These bacterins are attractive due to their simplified production process, which shows to be safer and faster compared to that from the conventional toxoid vaccines. However, these bacterins carry expression plasmids that contain a gene for kanamycin resistance (*kanR*), which could theoretically be transferred to environmental microorganisms in case of accidents. Considering this, the present study evaluated different concentrations of formaldehyde (0.2, 0.4, and 0.8%) regarding its ability of inactivating *E. coli*, and the possible presence of the kanamycin resistance gene (*kanR*) in the resulting cells. The concentration of 0.8% was able to inactivate a high density of cells in 24 h. While the impairment of *kanR* amplification via PCR was achieved using either 0.8% for 24 h, or 0.4% for 48 h. In addition, *E. coli* DH5α was unable of acquiring the extracted plasmids from the inactivation procedures with 0.4 or 0.8% for 48 h via electroporation. To test the possibility of horizontal gene transfer of *kanR*, the inactivated recombinant *E. coli* was co-incubated with other viable strains of *E. coli*, leading to no detectable gene transfer. These results show the efficacy of formaldehyde as an inactivation agent and, more importantly, the safety of *E. coli* bacterins regarding the possible kanamycin resistance gene transfer after inactivation.

Keywords: Bacterins; recombinant vaccines; selection marker; kanamycin; formaldehyde.

Introduction

Since the first descriptions of recombinant DNA technology in the 70s, different heterologous protein expression systems have been used and developed, such as mammalian and insect cells, or even plants, animals, fungi, algae, and bacteria [1]. Among these options, the bacterial expression system in *Escherichia coli* has been the most used and studied, allowing easier genetic manipulation due to the deep knowledge over its cellular mechanisms [2]. In addition, this expression system has now many options of strains and expression vectors that can be adapted for fermentation processes accordingly to the need [2,3]. Hence, *E. coli* can be easily adapted for industrial processes due to its fast growth in simple, low-cost media, and its high-yield production [3,4].

Purified recombinant vaccines have been shown to be a successful alternative for the production of veterinary vaccines [5,6,7]. However, the procedures for protein purification and possible further refolding hamper the industrial production [3]. On the other hand, the use of simpler approaches, such as the inactivation of whole cells of pathogenic *E. coli* has been described in human and veterinary medicine with good levels of safety and efficacy [8,9,10]. Considering this, inactivated recombinant bacterins surge as a cheaper alternative, once it does not need purification or refolding steps and are able to enhance immunological responses due to the presence of natural adjuvants, such as LPS [11,12].

Recent studies from our group have shown that recombinant bacterins of *E. coli* expressing the C-terminal part of botulinum neurotoxins (BoNT) C and D – called rH_CC and rH_CD, respectively – are able to induce protective antibody response according to Brazilian legislation [13,14]. Nevertheless, non-purified recombinant antigens are considered genetically modified microorganisms (GMO) and, thus, may contain active antibiotic-resistance genes in their expression vector [15]. In case these genes are actually present, these vaccines may offer risks for the environment in case of accidents [15,16,17]. Therefore, studies over the activity of this gene and possible transfer to other species are necessary.

The chemical detoxification process using formaldehyde has been commonly used in pharmaceutical industries due to its ability to inactivate bacterial and fungal products. Additionally, it acts on proteins modifying its active or immunogenic sites [18]. While for DNA molecules, formaldehyde acts changing its natural conformation, although the complete activity was not yet fully described [19]. Considering this, the present work aimed to evaluate the effect of formaldehyde in impairing the spread of the kanamycin resistance gene (*kanR*) present in the expression vector pLIA/H_CC of a recombinant bacterin against *Clostridium*.

Material and Methods

Construction of pLIA/H_CC vector

The coding sequence for H_CC was cloned into the expression vector pET28a (Invitrogen, CA, USA) using T4 DNA ligase reaction (Invitrogen, CA, USA) using both insert and vector digested with *Nhe*I and *Hin*dIII restriction sites following already described protocols [5], generating pLIA/H_CC vector.

Production of recombinant bacterins

The strain *E. coli* BL21 (DE3) Star was transformed with the plasmid pLIA/H_CC via heat shock. Transformed cells were inoculated in 50 mL of Luria-Bertani medium (LB, 1% (m/v) tryptone, 1% (m/v) NaCl, 0.5% (m/v) yeast extract) supplemented with 100 µg/mL kanamycin (LB-K), and growth in a shaker incubator (16 h, 37 °C, 150 RPM). This culture was used to inoculate another 450 mL of the same medium, which was incubated under same conditions (37 °C, 150 RPM) until OD_{600}=0.6-0.8 is reached. At this point, the expression of the rH_CC was induced with isopropril β-D-thiogalactopiranoside (IPTG) to a final concentration of 0.5 mM for 4h. After expression, the cultures were centrifuged (7,000 g; 10 min; 4 °C) and, for further tests with formaldehyde inactivation, had their concentrations adjusted to $2x10^8$, $2x10^9$, and $2x10^{10}$ CFU/mL in a total of 10 mL of PBS containing 0.2% (v/v), 0.4%, or 0.8% formaldehyde. As negative controls, the same amount of cells were prepared, but without the addition of formaldehyde. Each preparation was incubated for 4 days under 37 °C, 150 RPM. All the experiments was repetead twice.

Inactivation of the recombinant bacterins

The inactivation of *E. coli* with the different treatments was accessed in each of the 4 days. After every 24 h, a 100 µL aliquot was taken from each treatment and spread onto a LB-agar plate, which was incubated at 37 °C for 16 h. In addition, another 100-µL aliquot was directly inoculated in LB broth and incubated (16 h, 37 °C, 150 RPM). Each of the plates were used to determine the survival rate, while the liquid cultures had the growth quantified via spectrophotometry at 600 nm.

Plasmid DNA extraction

Plasmid DNA extractions were made using the kit Illustra plasmid Prep Mini Spin® (GE Healthcare), as well as with the alkaline lysis protocol (Green & Sambrook, 2012) [20]. Briefly, 1 mL, 100 µL, and 10 µL of the respective bacterial concentrations were collected to reach the same initial amount of cells for extraction. For the alkaline lysis, the cells were centrifuged (13,000 g, 3 min), and the pellet was suspended in solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4), followed by the addition of solution II (1% (m/v) SDS, 0.2 M NaOH) and III (3 M sodium acetate, pH 5.2). Then, the tubes were centrifuged (13,000 g, 5 min), the supernatant was taken and used for isopropanol precipitation, followed by ethanol 70% and elution in Milli-Q water.

Accessing the integrity of plasmid DNA

The plasmid samples were quantified with NanoVue™ Plus (GE Healthcare Life Science, USA), run in an 0.8% agarose gel, and stained with ethidium bromide.

Electroporation of *E. coli* DH5α with plasmid DNA from bacterins

The extracted plasmid DNA from the previous step were used to transform electrocompetent *E. coli* DH5α cells, which were prepared using protocols described elsewhere (Green & Sambrook, 2012). Briefly, a colony of *E. coli* DH5α was inoculated in 10 mL of LB and incubated in a shaker (16 h, 150 rpm, 37 °C). This culture was further inoculated in 100 mL LB, which was incubated under the same conditions until OD_{600}=0.6. Then, the culture was incubated on ice for 20 min, centrifuged (4500 × *g*, 15 min, 4 °C), and the pellet washed two times with chilled sterile Milli-Q water. Finally, the cells were suspended in glycerol 20 % (v/v), centrifuged (4,500 × *g*, 15 min, 4 °C), the pellet was suspended in the residual glycerol solution and adjusted to 10^{10} cells/mL. The level of electrocompetence (25 µF, 2.5 kV, 200 Ω) was tested via electroporation with 1 pg of pET28a(+). After the transformation, 1 mL of LB was used to recover the cells, which were incubated for 1 h (37 °C, 150 RPM). Then, 100 µL of the cells were spread onto LB-K agar plates and grown for 16h at 37 °C. The plates were then used to calculate the competency of the cells.

Once competency was determined, electrocompetent *E. coli* DH5α were under the same conditions with the plasmid DNA extracted from cells treated with formaldehyde. After recovering the transformed cells, however, 100 µL were used to inoculate 10 mL LB-K, which were incubated in a shaker (37 °C, 150 RPM, 24 h). The growth was checked by spectrophotometry at 600 nm.

Accessing the integrity of the kanamycin resistance gene (*kanR*) with PCR

To confirm the inactivation of *kanR*, a PCR was made using primers to initially amplify the whole expression cassette. The employed primers were: *kanR forward* 5´ AAGGATCTCAAGAAGATCCTTT ´3, and *kanR reverse* 5´AACAAAATATTAACGCTTACAA ´3, which result in an amplicon of 1063 bp. The reaction was performed using a *Taq* DNA polymerase kit (Ludwig™, EUA), according to the manufacturer, and 10 ng of plasmid DNA in a final volume of 25 µL. The reaction protocol was: 95 °C for 5 min; 95 °C for 30s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, times 35 cycles; and 72 °C for 10 min. Samples no inactived was used as control.

The presence of parts of *kan*R DNA in the amplicon of the previous reaction was acessed by Nested PCR using the primers: *kanR forward* 5´ ATTCAACGGGAAACGTCTTG ´3, and *kanR reverse* 5´ GATGGTCGGAAGAGGCATAA ´3, which gives an amplicon of 242 bp. The reaction was conducted the same way as the previous one.

Accessing the ability of recombinant bacterins to perform horizontal gene transfer to other *E. coli* strains

The ability of the bacterins in performing horizontal gene transfer to the *E. coli* strains TOP10, DH5α, and BL21 (DE3) pLysS was evaluated in co-cultivation experiments. For this, a single colony of each of TOP10 and DH5α was inoculated in 10 mL of LB containing $2x10^8$ CFU/mL of bacterins inactivated with 0.4 or 0.8 % (v/v) formaldehyde, which were previously washed for residual formaldehyde removal. The cell mixture was then incubated at 37 °C, 150 RPM for 7 days. The same procedure was conducted for BL21 (DE3) pLysS, with the exception that LB supplemented with 50 µg/mL chloramphenicol (LB-CLO) was used. After incubation, 100 µL of each co-cultivation was taken and spread onto LB-K, LB-CLO, LB-K-CLO or LB agar plates. The growth of any colony was documented after 24, 48, 72, 96, and 168 h.

Results

Formaldehyde is able to inactivate *E. coli* and impair the amplification of *kanR* cassette

The inactivation experiment showed that formaldehyde 0.2% (v/v) was enough to inactivate 2×10^8 CFU/mL of *E. coli* BL21 (DE3) Star, although it was not able to inactivate 2×10^9 and 2×10^{10} CFU/mL. When using 0.4%, both 2×10^8 and 2×10^9 were inactivated, while with 0.8%, all concentrations were inactivated after 24h incubation (Table 1).

When running an agarose gel with the plasmid DNA extraction, only the samples from the control (not inactivated) and the one treated with 0.2% formaldehyde could be seen. The remaining samples did not show any observable band.

Table 1. Inactivation profile of different amounts of *E. coli* BL21 (DE3) Star/pLIA/H_CC against formaldehyde 0.2, 0.4, and 0.8% (v/v).

	CFU/mL	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	10^8	+	+	+	+
	10^9	+	+	+	+
	10^{10}	+	+	+	+
0.2 %	10^8	-	-	-	-
	10^9	+	+	+	+
	10^{10}	+	+	+	+
0.4 %	10^8	-	-	-	-
	10^9	-	-	-	-
	10^{10}	+	+	+	+
0.8 %	10^8	-	-	-	-
	10^9	-	-	-	-
	10^{10}	-	-	-	-

(+) survival; (-) death.

Regarding the PCR amplification of the whole expression cassette of *kanR* gene, it was already not possible to observe amplicons from treatment with 0.8% formaldehyde after 24 h of inactivation. The absence of amplification was also verified with 0.4% after 48 h (Table 2). To confirm the presence of the gene in the samples, a shorter fragment of the gene (242 bp) was amplified in a sequential PCR reaction (nPCR), In this case, all samples showed the amplified fragment.

Table 2. Amplification profile of the whole *kanR* gene (PCR) and of the shorter *kanR* fragment (nPCR).

	CFU/mL	24 h		48 h		72 h		96 h	
		PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR
Control	10^8	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^9	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^{10}	+	+	+	+	+	+	+	+
0.2 %	10^8	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^9	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^{10}	+	+	+	+	+	+	+	+
0.4 %	10^8	+	+	+	+	-	+	-	+
	10^9	+	+	+	+	-	+	-	+
	10^{10}	+	+	+	+	-	+	-	+
0.8 %	10^8	-	+	-	+	-	+	-	+
	10^9	-	+	-	+	-	+	-	+
	10^{10}	-	+	-	+	-	+	-	+

(+) amplification; (-) no amplification.

Transformation of electrocompetent *E. coli* DH5α with the plasmid DNA extracted from recombinant bacterins

The plasmid DNA extracted from treatments containing 2×10^8 and 2×10^9 CFU/mL was not able to be inserted in *E. coli* DH5α via electroporation. On the other hand, the plasmid DNA from the treatments with 2×10^{10} CFU/mL and 0.2% formaldehyde for 24 and 48 h was able to transform *E. coli*. Nevertheless, the plasmid DNA obtained from 2×10^{10} CFU/mL treated with 0.4 and 0.8% did not show transformation after 24 h (Table 3).

Table 3. Growth profile of *E. Coli* DH5α transformed with plasmid DNA extracted from recombinant bacterins.

	Conc.	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	2×10^8	+	+	+	+
	2×10^9	+	+	+	+
	2×10^{10}	+	+	+	+
0.2%	2×10^8	-	-	-	-
	2×10^9	-	-	-	-
	2×10^{10}	+	+	-	-
0.4%	2×10^8	-	-	-	-
	2×10^9	-	-	-	-
	2×10^{10}	+	-	-	-
0.8%	2×10^8	-	-	-	-
	2×10^9	-	-	-	-
	2×10^{10}	+	-	-	-

(+) survival; (-) death.

Recombinant bacterins are not able to perform gene transfer with other *E. coli* strains

The co-cultivation of the *E. coli* strains DH5α, TOP10, and BL21 (DE3) pLysS with the recombinant bacterins showed no genetic transfer, since no resistance to the antibiotics was observed. Only the controls without antibiotics presented growth, including the pLysS strains that has natural chloramphenicol resistance (Table 4). This way, it is possible to affirm that the resistance genes are not able to be horizontally transferred when different bacteria are incubated together.

Table 4. Growth profile of *E. coli* strains DH5α, TOP10, and BL21 (DE3) pLysS in media containing different antibiotics after co-cultivation with recombinant bacterins.

Recombinant Bacterin (2×10^8 CFU/mL)	Strain	LB	LB+ Kan	LB +Clo	LB+Kan+Clo
0.4%	**Top10**	+	-	-	-
	pLysS	+	-	+	-
	DH5α	+	-	-	-
0.8%	**Top10**	+	-	-	-
	pLysS	+	-	+	-
	DH5α	+	-	-	-

(+) survival; (-) death

Discussion

The possible introduction of genetically modified microorganisms (GMM) into the environment is widely discussed regarding the possible problems it can bring [21]. With the rise in the use of GMM in pharmaceutical industry, it is crucial to understand the potential risk of antibiotic resistance genes escaping from the products to the environment. In this study, the vector pLIA, which contains a copy of *kanR* gene for kanamycin resistance, was used as object of study. This antibiotic has currently low relevance in human clinical treatment, since it has a limited spectrum and high toxicity, especially for liver, brain, and ears [22]. However, it is necessary to understand the possible dispersion of the resistance against this antibiotic into the environment, since this gene can be transferred to other organisms and cause risks to human and animal health.

Up to day, few studies were made over the horizontal gene transfer of recombinant bacteria to other microorganisms. Most of the works about this topic is focused on transgenic plants. For example, the genomic DNA extracted from the transgenic plant *Beta vulgaris* was able to be transferred to *Acinetobacter* spp. strains, making these strains resistant to kanamycin due to the gene present in the transgenic genome (23). In the same study, it is highlighted that the conditions used, such as DNA purity, competent cells, temperature, medium, and sterile environment were ideal for the incorporation of DNA into the bacterial genome, although these conditions are very improbable to happen naturally. Another essential point for the successful gene transfer was the high homology between the transfected DNA and the bacterial DNA. The possibility of natural transformation of the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* with plant DNA containing kanamycin resistance gene was also tested, showing that even after 12 months of contact, there was no gene transfer (17).

Formaldehyde is a potent and widely used inactivation agent for currently commercial vaccines, showing its efficacy and safety in many different applications (24). The inactivation of genetic modified bacteria is the first step for minimizing the risks associated with the possible scape of these microorganisms from the research and industrial places to the environment, what would turn their replication and gene transfer impossible. A study supporting the possible scape of GMM showed that residual water from laboratories contained high amounts of *E. coli* resistant to ampicillin [25]. Considering the results from the present study, it was possible to confirm the inactivation property of formaldehyde against recombinant bacteria, since 0.8% (v/v) of it was enough to inactivate high densities of recombinant *E. coli* in only 24 h. Moreover, the plasmid DNA of the inactivated bacteria containing the *kanR* gene was extracted and analyzed in agarose gel, indicating that the DNA was modified, since it was not detected.

In order to observe if electrocompetent *E. coli* are able to acquire genetic material from the bacterins, highly competent cells (10^9 transformants/µg DNA) were electroporated with plasmid DNA from bacterins. In this experiment, it was possible to observe positive transformation with DNA extracted from bacterins with $2x10^{10}$ CFU/mL and treated for 24 h. After treatment for 48 h with 0.4 or 0.8% formaldehyde, non transformants were observed. Similarly, PCR reactions to amplify the whole *kanR* cassette were negatively affected when cells were treated with 0.4% and 0.8% formaldehyde for 48 h, since no amplification was observed. On the other hand, when performing Nested PCR, it was possible to observe that the smaller amplicon of *kanR* (242 bp) was obtained, although this fragment is not enough to confer

resistance. In a general view, the absence of amplicons in the first PCR, together with the lack of transformation of *E. coli* with extracted plasmid DNA from bacterins, indicate that formaldehyde is able to modify the *kanR* gene.

Regarding the possibility of horizontal gene transfer between recombinant and laboratory strains of *E. coli*, previous works described the possibility of conjugation between *E. coli* containing a recombinant plasmid and other 5 different microorganisms, in which 4 of these microorganisms received the transgene [25]. In this same study, it is also mentioned that the transfer rate was very low considering the optimal conditions of the experiments. In the present work, the *E. coli* strain BL21 (DE3) Star, which has no gene for the F-pilus for conjugation and gene transfer, making the gene transfer very unlikely. This was confirmed in the present study, where $2x10^8$ CFU/mL of recombinant bacterins inactivated with 0.4% and 0.8% formaldehyde were not able to transfer the *kanR* gene to other strains after co-cultivation.

In another study, genetically modified *Lactobacillus* used as probiotic were analyzed regarding its capacity of changing the mice microbiota, concluding that there were no adverse changes in its anatomy or biochemical properties [26]. The recombinant bacterin showed in the present work is described to be injected either subcutaneously or intramuscularly, what in principle do not allow interactions with the microbiota and, consequently, would not result in modifications of the natural bacteria. As to the possibility of genetic transfer tested in the present study, it was possible to address that the horizontal gene transfer from bacterins to other bacteria is practically inexistent. Considering the experiments shown here, the optimal conditions for gene transfer were provided, such as temperature, pH, and medium. This situation provides an environment much more prone for gene transfer than it could naturally occur, since that even if a GMM were dispersed to the natural environment, the chances of its persistence there and of finding the proper conditions to promote conjugation are extremely low. Additionally, many places from the natural environment, such as soil and water, have many factors for DNA degradation (e.g. DNAses and UV light), as well as a huge microbial competition for nutrients, which together turn practically impossible the transfer of genetic material from formaldehyde-inactivated bacterins to other organisms.

Conclusion

As to our knowledge, this is the first study addressing the possible antibiotic resistance gene transfer from recombinant bacterins used as veterinary vaccines. The presented results showed that the treatment of recombinant *E. coli* with 0.8% (v/v) formaldehyde for 48 h is enough to inactivate a high-density cultivation and avoid the amplification of the whole *kanR* gene cassette. Furthermore, plasmid DNA extracted from these cells was incapable of transforming electrocompetent *E. coli* via electroporation. These results show that gene transfer from the bacterins is very unlikely to occur, especially in a natural environment. Moreover that, it is expected that this kind of study can support the creation and improvement of protocols for the production of genetically modified immunogens, making their production easier and safer.

Acknowledgements

We would like to thank all the researchers and components of the Applied Immunology Laboratory (UFPel, Pelotas, RS, Brazil), and to the funding agencies CNPq and FAPERGS for the scholarships and financial support. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Authors' contributions

Study design: Rafael Amaral Donassolo, Marcos Roberto Alves Ferreira, Clovis Moreira Jr, Fabricio Rochedo Conceição.

Experimental execution: Rafael Amaral Donassolo, Emili Griep, Marcos Roberto Alves Ferreira, Lucas Moreira dos Santos

Data interpretation and analysis: Rafael Amaral Donassolo, Marcos Roberto Alves Ferreira, Gustavo Marçal Schmidt Garcia Moreira, Fabricio Rochedo Conceição.

Funding management: Fabricio Rochedo Conceição, Angela Nunes Moreira.

Writing: Rafael Amaral Donassolo, Marcos Roberto Alves Ferreira, Gustavo Marçal Schmidt Garcia Moreira, Lucas Moreira dos Santos, Fabricio Rochedo Conceição.

References

1- Clark, T.; Cassid-Hanley, D. Recombinant Subunit Vaccines: Potential and Constraints. Development in Biologicals. 2005. 121:153–163. PMID: 15962478

2- Huang CJ, Lin H, Yang X (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. J Ind Microbiol Biotechnol. 2012; 39(3): 383-399.https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9

3- Moreira GMSG, Cunha CEP, Salvarani FM, Gonçalves LA, Pires PS, Conceição FR, Lobato FCF.Production of recombinant botulism antigens: A review of expression systems. Anaerobe. 2014; 28: 130-136. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.06.003

4- Vincentelli, R.; Romier, C.; Expression in *Escherichia coli*: becoming faster and more complex. Current Opinion in Structural Biology. 2013; 23(3): 326-334. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.01.006

5- Moreira C, da Cunha CEP, Moreira GMSG, Mendonça M, Salvarani FM, Moreira ÂN, Conceição FR. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxina serotypes C and D (2016). Anaerobe. 2016; 40:58–62. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.012

6- Salvarani, F., Conceição, F., Cunha, C., Moreira, G., Pires, P., Silva, R., Lobato, F. Vaccination with recombinant *Clostridium perfringens* toxoids α and β promotes elevated antepartum and passive humoral immunity in swine. Vaccine. 2013; 31(38): 4152–4155. http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.094

7- Cunha, CEP., Moreira, GMSG., Salvarani, FM., Neves, MS., Lobato, FCF., Dellagostin, OA. et al. Vaccination of cattle with a recombinant bivalent toxoid against botulism serotypes C and D. Vaccine. 2014; 32(2): 214–216. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.025

8- Lu, X., Clements, JD., Katz, J. M. Mutant Escherichia coli heat-labile enterotoxin [LT (R192G)] enhances protective humoral and cellular immune responses to orally administered inactivated influenza vaccine. Vaccine, 2002; 20; 1019–1029. PMID: 11803061

9- Wenneras, C., Svennerholm, AN., Ahrein, C., Czerkinsky, C.Antibody-Secreting Cells in Human Peripheral Blood after Oral Immunization with an Inactivated Enterotoxigenic *Escherichia coli* Vaccine. *Infection and Immunity*. 1992; *60*(7), 2605–2611. PMID: 1612730

10- Qadri, F., Ahmed, T., Ahmed, F., Ara, Y., Sack, DA., Svennerholm, A.Reduced doses of oral killed enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine is safe and immunogenic in Bangladeshi infants 6 – 17 months of age : Dosing studies in different age groups,. Vaccine. 2006; 2 (10): 1726–1733. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.110

11- Stubbs A, Martin K, Coeshott C, Skaates S, Kuritzkes D, Bellgrau D, Wilson C. Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. Nature Medicine. 2001; 7: 625–9. https://doi.org/10.1038/87974

12- Trott D, Hellestad E, Yang M, Cook M. Additions of killed whole cell bacteria preparations to Freund complete adjuvant alter laying hen antibody response to soluble protein antigen. Poultry Science. 2008; 87(5): 912–7. https://doi.org/10.3382/ps.2007-00481

13- Moreira Jr, C., Ferreira, MRA., Cunha, CEP., Donassolo, RA., Finger, PF., Moreira, GMSG., et al. Immunogenicity of a Bivalent Non-Purified Recombinant Vaccine against Botulism in Cattle. Toxins. 2018; 10(381), p.1–10. https://doi.org/10.3390/toxins10100381

14- Otaka, DY., Barbosa, JD., Moreira Jr, C., Ferreira, MRA., Cunha. CEP., Brito, ARS, et al Humoral Response of Buffaloes to a Recombinant Vaccine against Botulism Serotypes C and D. Toxins.2017; 9(297):1–6. https://doi.org/10.3390/toxins9100297

15- Prakash D, Verma S, Bhatia R, Tiwary BN). Risks and Precautions of Genetically Modified Organisms. ISRN Ecology. 2011; 2011:1-13. http://dx.doi.org/10.5402/2011/369573

16- Keese P. Risks from GMOs due to Horizontal Gene Transfer. Environ. Biosafety Res. 2008; 7(3):123-149. https://doi.org/10.1051/ebr:2008014

17- Friedrich DC, Passaglia MP. Avaliação da possibilidade de ocorrência natural de transformação de *Azospirillum brasiliense* com DNA de plantas contendo o gene de resistência a canamicina. Brazilian Journal of Bioscience.2005; 2:151-158.

18- Andersen MT, Jorgensen SB, Wilhelmsen ES, Petersen JW, Hojrup P. Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin. Vaccine. 2007; 25(12): 2213–2227. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.033

19- Hoffman, EA., Frey, BL., Smith, LM., Auble, DT. Formaldehyde crosslinking: a tool for the chromatin complexes. Journal of Biological Chemistry.2015; 290(44): 26404–26411. https://doi.org/10.1074/jbc.R115.651679

20- Green MR, Sambrook J, Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2012, 4ºed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

21- Velkov, V.V . Stress-induced evolution and the biosafety of genetically modified microorganisms released into the environment. Journal of Bioscience.2001; 26(5):667–683. PMID: 11807296

22- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6032, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6032 (accessed Nov. 9, 2018)

23- Gebhard F, Smalla K. Transformation of Acinetobacter sp. Strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. Appl. Environ. Microbiol. 1998; 64(4) :1550–1554. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106187/

24- Werzberger A, Mensch B, Kuter B, et al. A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis a vaccine in healthy children. N Engl J Med 1992: 327-453. https://doi.org/10.1056/NEJM199208133270702

25- Wichmann F, Wyrschi I, Frank J, Müller M, Bertschi N, Brodmann P, Bagutti. Monitoring of genetically modified Escherichia coli in laboratory wastewater. Environmental Science and Pollution Research. 2017; 24 (30): 23725-23734. https://doi.org/10.1007/s11356-017-0021-3

26- Lee, KC., Liu, CF., Lin, TH., Pan, TM. Safety and risk assessment of the genetically modified Lactococci on rats intestinal bacterial flora. International Journal of Food Microbiology, 2010; 142(1–2):164–169. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.018

5. Conclusão

De acordo com os resultados aqui demonstrados, pode-se concluir que o formaldeído é um potente inativador de alta concentração de *E. coli* recombinante, assim como de seu material genético. Dessa forma, impede a dissipação e amplificação do *kan*R minimizando os riscos associados a liberação acidental no ambiente.

Referências

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular.** 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 552 p.

ANDERSEN, M.T. et al. Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin. **Vaccine**. v.25, p. 2213–2227, 2007.

ANDERSEN, P.; DOHERTY, T. M. The success and failure of BCG-implications for a novel tuberculosis vaccine. **Nature Reviews Microbiology.** v. 3, n. 8, p. 656-662, 2005.

ANDERSON, C. Production and delivery of recombinant subunit vaccines. Royal Institute of Technology Department of Biotechnology, Stockholm. 2000.

ARNON, R., BEN-YEDIDIA, T. Old and new vaccine approaches. **International Immunopharmacology**. v. 3, n. 8, p. 1195–1204, 2003.

AVERY, O.T.; GOEBEL, W.F. Chemo-Immunological Studies on Conjugated Carbohydrate-Proteins II Immunological Specificity of Synthetic Sugar-Protein Antigens. **Journal of Experimental Medicine**. v. 50, n. 4, p. 533–550, 1929.

AZEVEDO, J.S.C. **Caderno de Medicina de Cães e Gatos. Canoas**, p. 127-141, 2002

BAKER, P.J. T cell regulation of the antibody response to bacterialpolysaccharide antigens: an examination of some general characteristicsand their implications. **Journal of Infectious Disease**. v. 165, n.1, p. 44–48, 1992.

BALESTIERI, F. **Imunologia.** 1.ed. Barueri: Manole, 2005, 840 p.

BERCHE, P. Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. **Clinical Microbiology and Infection.** v. 18, n. 5, p. 1-6, 2012.

BEVAN, M.W.; FLAVELL, R.B.; CHILTON, M.D. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Biotechnology.** v. 24, p. 367–370, 1983.

BHAUMIK, S. Polio eradication: current status and challenges. **Journal of Family Medicine and Primary Care**. v. 1, n. 2, p. 84–85, 2012.

BRASIL. Lei Ordinária nº. 11.105, de 24 de março 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados,

cria o Conselho Nacional de Biossegurança. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm Acesso em 18 nov. 2018.

BRAZ, L.C.C. et al. Contribuições da biotecnologia no desenvolvimento e produção de vacinas de primeira, segunda e terceira gerações. **Saúde e Ciência**. v. 3, n. 3, p. 198-206, 2014.

BYRD, D.R.; MATSON, S.W. Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. **Molecular microbiology**, v. 25, n. 6, p. 1011-1022, 1997.

CABRERA, G.P.B. et al. The Leishmune's Nucleoside hydrolase DNA vaccine as an aid inimmunotherapyof canine visceral leishmaniasis. **Procedia Vaccinology**. v. 6, p. 64–73, 2012.

CANAL, C.W.; VAZ, C.S.L. Vacinas víricas. Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas. 2.ed. Santa Maria: SM, 2012. 1008 p.

CHEN, R. et al. The vaccine adverse event reporting system (VAERS). **Vaccine**. v.12, n. 6, p. 542-550, 1994.

CLARK, T.; CASSIDY-HANLEY, D. Recombinant Subunit Vaccines: Potential and Constraints. **Development in Biologicals**. v.121, p.153–163, 2005.

CLEM, A.S. Fundamentals of vaccine immunology. **Journal of global infectious diseases**. v.3, n.1, p. 73–78, 2011.

COLER, R.N., REED, S.G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends Parasitology**. v. 21, p. 244-249, 2005.

DA COSTA, Marco Antonio F.; DA COSTA, Maria de Fátima B. Biossegurança de OGM: uma visão integrada. Publit Soluções Editoriais, 2009.

DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; DE GREGORIO, E. Vaccines for the 21st century. **EMBO Molecular Medicine**. v. 6, n. 6, p. 708-720, 2014.

DINIZ, M.O.; FERREIRA, L.C.S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos Avançados**. v. 24, n. 70, p. 19-30, 2010.

DUDEK, N.L. et al. Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. **Current Pharmaceutical Design.** v.16, n. 28, p. 3149-3157, 2010.

EHRETH, J. The global value of vaccination. **Vaccine.** v. 2, p. 596-600, 2003.

FERREIRA, M.R.A. et al. Immunogenicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin recombinant bacterin in rabbit and ruminants. **Vaccine**, 2018.

FREY, J. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. **Vaccine.** v. 25, n. 30, p. 5598-5605, 2007.

FRIEDRICH, D.C.; PASSAGLIA, M.P. Avaliação da possibilidade de ocorrência natural de transformação de Azospirillum brasiliense com DNA de plantas contendo o gene de resistência a canamicina. **Brazilian Journal of Bioscience.** v.2, p. 151-158, 2004.

FU, Y.H. et al. Deletion analysis of the F plasmid oriT locus. **Journal of bacteriology**. v. 173, n. 3, p. 1012-1020, 1991.

GASPAR, E.B., SANTOS, L.R. Vacinação de bovinos: Esclarecendo algumas dúvidas. **Revista Embrapa.** v. 134, p. 1-39, 2014.

HASSON, S.S.A.A.; AL-BUSAIDI, J.K.Z , SALLAM, T.A. The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** v. 5, n. 5, p. 344-353, 2015.

HJERPE, C. Clostridial disease vaccines. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practic**. v. 6, p. 222–234, 1990.

HOFFMAN, E.A. Formaldehyde crosslinking: a tool for the chromatin complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, p. 26404–26411, 2015.

HOWARD, M.T.; NELSON, W.C.; MATSON, S.W. Stepwise assembly of a relaxosome at the F plasmid origin of transfer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 47, p. 28381-28386, 1995.

HUANG, C.J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**. v.39, p. 383-399. 2012.

HUANG, D.B., WU, J.J., TYRING, S.K. A review of licensed viral vaccines, some of their safety concerns, and the advances in the development of investigational viral vaccines. **Journal of Infection**. v. 49, n. 3, p. 179–209. 2004.

HUCKRIEDE, A. et al. The virosome concept for influenza vaccines. **Vaccine**. v. 23, n. 1, p. 26–38, 2005.

IDRIS, N.F. et al. Nanotechnology Based Virosomal Drug Delivery Systems. **Journal of Nanotechnology and Materials Science.** v. 1, n. 1, p. 27-37, 2014.

JIVANI, H.M. et al. Veterinary vaccines: past, present and future-a review. **International Journal of Science, Environment and Technology.** v. 5, n. 5, p. 3473-3485, 2016.

KALIL, J.; CUNHA-NETO, E.; GUILHERME, L. New Strategies in Vaccines. **Gazeta médica da Bahia**. v. 78, n. 1, p. 65-71, 2008.

KALRA, N. et al. Virosomes? As a drug delivery carrier. **American Journal of Advanced Drug Delivery**. v.1, p. 29-35, 2013.

KEESE, P. Risks from GMOs due to Horizontal Gene Transfer. **Environmental Biosafety Research.** v.7, p. 123-149. 2008.

LAHARIYA, C. A brief history of vaccines e vaccination in India. **The Indian Journal of Medical Research**. v. 139, n. 4, p. 491-511, 2014.

LAURING, A.S.; JONES, J.O.; ANDINO, R. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. **Nature Biotechnology**. v. 28, n. 6, p. 573-579, 2010.

LOMBARD, M., PASTORET, P.P., MOULIN, A.A. A brief history of vaccines and vaccination. **Revue scientifique et technique** (International Office of Epizootics). v. 26 n. 1 p. 29-48, 2007.

McVEY, S., SHI, J. Vaccines in veterinary medicine: a brief review of history and technology. **Veterinary Clinics of North America**: **Small Animal Practice.** v. 40, n. 3, p. 381-392, 2010.

MIKI, B.; MCHUGH, S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **Journal of Biotechnology**. v.107, p. 193–232, 2004.

MOREIRA-JR, C. Immunogenicity of a Bivalent Non-Purified Recombinant Vaccine against Botulism in Cattle. **Toxins**. v.10, n. 38, p. 1–10, 2018.

MOREIRA-JR, C. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxina serotypes C and D. **Anaerobe**. v. 40, p. 58–62, 2016.

MOREIRA, G.M.S.G. Immunogenicity of a Trivalent Recombinant Vaccine Against Clostridium perfringens Alpha, Beta, and Epsilon Toxins in Farm Ruminants. **Scientific Reports,** v. 6, p. 1-9, 2016.

MOREIRA, G.M.S.G. Production of recombinant botulism antigens: A review of expression systems. **Anaerobe**. v.28, p. 130–136, 2014.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7.ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010. 889 p.

NAGILL, R., KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. **International Immunopharmacology**. v. 1, n. 10, p. 1464-1488, 2011.

NASCIMENTO, I.; LEITE, L. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. **Brazilian Journal of Medical and Biologial Research.** v. 45, p. 1102–1111, 2012.

PINTO, E.F., MATTA, N.E., DA-CRUZ, A.M. Progressos e novos desafios para o controle de doenças imunopreveníveis. **Acta Biológica Colombiana.** v. 16, n. 3, p. 197-212, 2011.

PLOTKIN, S.A. Vaccines: the fourth century. **Clinical Vaccine Immunology.** v. 16, n.12, p.1709–1719, 2009.

PRAKASH, D. et al. Risks and Precautions of Genetically Modified Organisms. **ISRN Ecology**. v. 2011, p. 1-13, 2011.

RAPPUOLI, R.; Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine**. v.19, p.2688–2691, 2001.

RATHORE, P.; SWAMI, G. Virosomes: a novel vaccination technology. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.** v. 3, n. 10, p. 3591-3597, 2012.

RIEDEL, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. **BUMC Proceedings**. v. 18, n. 1, p. 21–25, 2005.

ROSANO, G.L.; CECCARELLI, E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**. v. 5, n. 172, p. 1-17, 2014.

SÁFADI, M.A.P.; BARROS.; A.P. Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combinations. **Jornal da pediatria**. v. 82, n. 3. p. 35-44, 2006.

SCARSELLI, E. Viral Vectored Vaccines: A New Era of Vaccination. **International Trends in Immunity.** v. 3, n. 4, p. 105-111, 2015. SINGH, N. et al. Virosomes as Novel drug delivery System: An Overview; **PharmaTutor**. v. 5, n. 9, p. 47-55, 2017.

SCHATZMAYR, H.G. Novas perspectivas em vacinas virais.**História, Ciências, Saúde- Manguinhos.** v. 10, n. 2, p. 655-669, 2003.

SINGH, N. et al. Virosomes as Novel drug delivery System: An Overview; **PharmaTutor**. v. 5, n. 9, p. 47-55, 2017.

SMALLA, K. et al. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria. In PROCEEDINGS OF THE SIXTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOSAFETY OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS. 2000. p. 146-154

SOWAJASSATAKUL, A. et al. Overexpression of eis without a mutationin promoter region of amikacin and kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strain. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.** v. 17, n. 33, p. 1-7, 2018

STOTZKY, G. Gene transfer among bacteria in soil. **Gene transfer in the environment**, p. 165-222, 1989.

STRASSBURG, M.A. The global eradication of smallpox. **American Journal** of **Infection Control**. v. 10, n. 2, p. 53-59, 1982.

TAHAMTAN, A. et al. An overview of history, evolution, and manufacturing of various generations of vaccines. **Journal of Archives in Military Medicine.** v. 5, n. 3, p. 1-7, 2017.

TOVEY, M.G.; LALLEMAND, C.; THYPHRONITIS, G. Adjuvant activity of type I interferons, **Biological Chemistry**. v. 389, n. 5, p. 541-545, 2008.

URA, T.; OKUDA, K.; SHIMADA, M. Developments in Viral Vector-Based. **Vaccines.** v.3, n.3, p. 624-641, 2014.

VARELLA, M.D.; PLATIAU, A.F.B. **Princípio da Precaução**. Belo Horizonte: Del Rey, 2004.

VANDERMEULEN, G. et al. New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trials. **Molecular Therapy**, v.19, n. 11, p.1942-1949, 2011.

VELKOV, V.V. Stress-induced evolution and the biosafety of genetically modified microorganisms released into the environment. **Journal of Bioscience**, v. 26, n. 5, p.667–683, 2001.

VINCENTELLI, R.; ROMIER, C.; Expression in Escherichia coli: becoming faster and more complex. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 23, n. 3, p. 326-334, 2013.

WILBER, Mathew. **Building a History of Horizontal Gene Transfer in *E. Coli*. HMC Senior Theses.** 2016. 36 f. Departament of Mathematics. Harvey Mudd College. Califórnia. 2016.

WILKINS, B.M. Factors influencing the dissemination of DNA by bacterial conjugation. **Bacterial genetics in natural environments**. Dordrecht: Springer. p. 22-30. 1990.

WILLETTS, N.; WILKINS, B. Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. **Microbiological reviews**, v. 48, n. 1, p. 24, 1984.

WILLIAMS, J.A. Vector design for improved DNA vaccine efficacy, safety and production. **Vaccines,** v. 1, p. 225–249, 2013.

YIN, X.; STOTZKY, G. Gene transfer among bacteria in natural environments. **Advances in applied microbiology**, v. 45, p. 153-212, 1997.

ZINDER, N.D.; LEDERBERG, J. Genetic exchange in *Salmonella.* **Journal of Bacteriology.** v.64, p. 679-699, 1952.