

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

RENATA MONTEIRO MAIA

**Papel do repressor transcricional *rv3405c* na vida intracelular do
Mycobacterium bovis BCG Moreau**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: **Dra. Leila de Mendonça Lima**

Rio de Janeiro

2017

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

RENATA MONTEIRO MAIA

**Papel do repressor transcricional *rv3405c* na vida intracelular do
Mycobacterium bovis BCG Moreau**

Orientadora: Dra. Leila de Mendonça Lima

Revisor: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz)

Examinadores:

1. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani (Presidente; Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz)
2. Dr. Luis Caetano Martha Antunes (CRPHF – ENSP – Fiocruz)
3. Dr. Paulo Redner (CRPHF – ENSP – Fiocruz)

Suplentes:

4. Dra. Rosa Teixeira de Pinho (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz)
5. Dra. Marcia de Bêrredo Pinho Moreira (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz)

FICHA CATALOGRÁFICA

Maia, Renata Monteiro .

Papel do repressor transcricional rv3405c na vida intracelular do *Mycobacterium bovis* BCG Moreau / Renata Monteiro Maia. - Rio de Janeiro, 2017.

112 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Leila de Mendonça Lima.

Bibliografia: f. 88-96

1. rv3405c. 2. BCG Moreau. 3. THP-1. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Papel do repressor transcricional *rv3405c* na vida intracelular do *Mycobacterium bovis* BCG Moreau

RESUMO

Mycobacterium bovis BCG é a única vacina disponível na prevenção da tuberculose, doença infecciosa causada pelo *M. tuberculosis* e responsável por 1,8 milhão de mortes em 2015. “BCG” é uma família de cepas geneticamente distintas pela perda de diferentes regiões genômicas (RD), além de outros tipos de mutações como inserções/deleções e SNPs. BCG Moreau, cepa usada no Brasil, perdeu a região genômica RD16, levando ao truncamento do gene que codifica o regulador transcricional Rv3405c, que regula negativamente a expressão de Rv3406, uma alquil sulfatase. Para avaliar o impacto da perda da *rv3405c*, uma cepa de BCG Moreau carreando apenas o vetor (M Δ 05c) e uma cepa complementada (M::05c) foram usadas para infectar macrófagos humanos da linhagem THP-1, para avaliar: a viabilidade das cepas recombinantes, o padrão de citocinas secretadas (TNF- α , MIP-1 β , IL-1 β , IL-6 e IL-8) e a viabilidade das células hospedeiras. Células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos e infectadas com MOI de 1 e 10 (bactéria:célula). Todas as variáveis foram analisadas em tempos determinados de 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção. Nossos resultados demonstram que a viabilidade de M Δ 05c é maior do que M::05c tanto em meio axênico quanto no ambiente intracelular, sugerindo um possível ganho funcional associado à expressão constitutiva de Rv3406. Por outro lado, a viabilidade das células hospedeiras não apresenta diferenças significativas quando infectadas pelas cepas recombinantes. Observamos diferenças relativas ao perfil de secreção das citocinas em alguns tempos de infecção analisados, normalmente mais elevado nas células infectadas por M Δ 05c, exceto para IL-6, cuja secreção foi maior em células infectadas pela cepa complementada. Nossos resultados também mostraram que o gene *rv0405* possui uma região com maior identidade com motivo palindrômico identificado como possível locus de ligação para o fator transcricional Rv3405c. Com relação à análise da expressão gênica, nossos dados preliminares mostram que não houve diferença na expressão dos alvos analisados (*rv0405*, *rv0667*, *rv1116* e *rv3616c*) entre as cepas recombinantes e que a presença da proteína Rv3406 não foi detectada na cepa complementada. Este trabalho contribui para elucidar o impacto da deleção genômica RD16 na fisiologia da cepa vacinal brasileira, BCG Moreau.

Role of the *rv3405c* transcriptional repressor in the intracellular lifestyle of *Mycobacterium bovis* BCG Moreau

ABSTRACT

Mycobacterium bovis BCG is the only available vaccine against tuberculosis, an infectious disease caused by *M. tuberculosis* and responsible for 1.8 million deaths in 2015. “BCG” comprises a family of genetically different strains derived by the loss of different genomic regions (RDs) and other types of mutations such as insertions/deletions and SNPs. BCG Moreau, the strain used in Brazil, lost the genomic region RD16, leading to the truncation of the gene encoding a transcriptional regulator, *rv3405c*, which negatively regulates the expression of Rv3406, an alkyl sulfatase. To evaluate the impact of the loss of *rv3405c*, BCG Moreau harboring the empty vector (M Δ 05c) and the complemented strain (M::05c) were used to infect human macrophages of the THP-1 lineage in order to evaluate: the viability of the strains, the pattern of secreted cytokines (TNF- α , MIP-1 β , IL-1 β , IL-6 and IL-8) and viability of the host cells. THP-1 cells were differentiated into macrophages and infected at a MOI of 1 and 10 (bacteria:cell). All the variables were analysed in defined time points of 6, 24, 48, 72 and 96 hours after infection. Our results show that the viability of M Δ 05c is higher than that of M::05c in both axenic medium and in the intracellular environment, suggesting a possible functional gain associated with constitutive expression of Rv3406. On the other hand, the viability of host cells does not show significant differences when infected by the recombinant strains. We observed differences relative to the cytokine secretion profile in some of the analysed time points, normally higher in cells infected with M Δ 05c, except for IL-6, which was more elevated in cells infected with the complemented strain. Our results also showed that the *rv0405* gene has a region with greater identity to the palindromic motif identified as the possible binding site of the transcription factor Rv3405c. In regards to the gene expression analysis between the recombinant strains, our preliminary results show that no significant differences in the expression of the analyzed targets (*rv0405*, *rv0667*, *rv1116* and *rv3616c*) could be detected and that the presence of the Rv3406 protein was not detected in the complemented strain. This work contributes to the elucidation of the impact of the genomic deletion RD16 in the physiology of the Brazilian vaccine strain, BCG Moreau.

Trabalho realizado no Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática (LAGFB/IOC), sob orientação da Dra. Leila de Mendonça Lima.

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério.

É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas;

Mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros;

Mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

(Cora Coralina)

Aos maiores amores da minha vida: meu pai, Armando e minha filha, Gabriela. Vocês têm o melhor de mim! Minhas saudades eternas e todo o meu amor. Até o nosso reencontro! (in memoriam)

À minha mãe, Marlene, minha fonte inesgotável de amor e alegria. Vc é minha inspiração!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Armando e Marlene, obrigada por tanto amor, cuidado e dedicação ao longo de toda a vida. Nunca, nada faria sentido sem vocês. Meu maior orgulho é ser filha de vocês. Amo ao infinito e além!

Às minhas Lisa e Meg por encherem todos os dias a minha vida com tanta alegria e amor que eu nem sei se mereço!

À Dra. Leila, por ter me recebido e acolhido como sua aluna de doutorado. Obrigada pelo enorme aprendizado e pelo exemplo de profissional.

À Dra. Mariana Waghabi e ao Dr. Wim Degrave por terem me recebido no LAGFB de braços abertos.

À Dra. Teca Galvão, pelas dicas e ensinamentos.

A toda equipe do LAGFB, aos que estão e aos que não estão mais por aqui, pelo carinho e risos diários, pelo exemplo de equipe e profissionalismo. Adoro cada um de vocês: Alessandra, Aline, Anael, Beto, Bia, Bianca, Carla, Carol, João, Juliana, Leandro, Marcos, Marília, Matheus, Mayra, Neiva, Paloma, Pâmela, Rayane, Renata, Sindy e Sônia.

À plataforma de Citometria de Fluxo do IOC, especialmente a Cynthia Cascabulho, pelos experimentos com dosagem de citocinas e pela generosidade e amizade com que sempre sou recebida.

À plataforma de Bioensaios e triagem de fármacos do IOC, especialmente a Elid Fernandes e Monica Alcon pela ajuda e pelo carinho.

À Dra. Rosa Teixeira de Pinho, do Laboratório de Imunologia Clínica, por todos os anos de amizade, de aprendizado e pela ajuda com os ensaios de ELISA. Agradeço também a Periel Vasconcelos pelo carinho e apoio.

Ao Dr. Otacílio Moreira pela disponibilidade e atenção durante os experimentos com RNA. Agradeço ainda a Maria Angélica Cardoso e a Alice Fernandes, da plataforma Fiocruz de PCR em tempo real RPT09A, pelo carinho e ajuda com os experimentos.

À Dra. Cristina Pessolani pela revisão deste trabalho e aos membros da banca e suplentes pelas contribuições.

À Julimar da secretaria acadêmica pelo carinho e paciência de sempre.

À CAPES por todo apoio e incentivo à pesquisa e aos programas de pós-graduação.

A todos os amigos que torcem por mim e que contribuem todos os dias para o meu crescimento pessoal.

A Deus... nunca foi sorte, sempre foi você!

LISTA DE SIGLA E ABREVIATURAS

- ADC – Albumina, Dextrose e Catalase
- BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente
- BCG – Bacilo de Calmette e Guèrin
- cDNA – fita complementar ao ácido desoxirribonucleico
- DEPC – dietilpirocarbonato
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- DO – densidade ótica
- DOTS – tratamento diretamente observado (*Directly Observed Treatmet Short Course*)
- ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)
- EMSA – Ensaio da mudança da mobilidade eletroforética (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)
- ESAT-6 – *Early Secreted Antigen Target 6 kDa*
- ESX-1 – *ESAT-6 Secretion System*
- FAP – Fundação Ataulpho de Paiva
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)
- IL-1 β – interleucina 1-Beta
- IL-6 – interleucina 5
- IL-10 – interleucina 10
- IS6110 – sequência de inserção 6110
- hsp – *heat shock protein*
- M. tb* – *Mycobacterium tuberculosis*
- MIP-1 β – *Macrophage inflammatory protein-1 Beta*
- MOI – multiplicidade de infecção
- MW – peso molecular (molecular weight)
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis)

pb – par (es) de base

PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PDIM – dimicolato de ftiocerol

PGL – glicolípídeo fenólico

PMA – *Phorbol Myristate Acetate*

RT-qPCR – *reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction*

RD – região de diferença ou região de deleção

RNA – ácido ribonucleico

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – *reverse transcription polymerase chain reaction*

SCID – Imunodeficiência combinada severa (*Severe combined Immunodeficiency*)

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TA – temperatura ambiente

TCA – ácido tricloroacético

TB – tuberculose

TBE – Tris-Borato-EDTA

TBS – Tris buffered saline

TE – Tris-EDTA

TNF- α – *Tumor necrosis factor-alpha*

WB – *Western blot*

WHO – *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Incidência estimada de tuberculose no mundo em 2015	5
Figura 1.2	Receptores presentes nos macrófagos conhecidos pelo envolvimento com <i>M. tb</i> ou seus componentes	9
Figura 1.3	Genealogia das vacinas BCG	16
Figura 1.4	A região <i>rv3405c</i> em <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Moreau	23
Figura 1.5	Reações catalisadas por Rv3406	24
Figura 3.1	Localização dos oligonucleotídeos usados nos ensaios de identificação genética	32
Figura 4.1	Morfologia das colônias M Δ 05c e M::05c	46
Figura 4.2	Identidade genética dos BCGs recombinantes	47
Figura 4.3	Comparação do perfil de crescimento das cepas recombinantes M Δ 05c e M::05c em meio axênico	49
Figura 4.4	Localização no genoma de <i>M. tuberculosis</i> e função dos genes selecionados para o nosso estudo	50
Figura 4.5	Amplificação, através da técnica de PCR, das regiões onde o motivo de ligação da região intergênica <i>rv350c-3406</i> se liga aos genes possivelmente regulados por <i>rv3405c</i>	51
Figura 4.6	EMSA (Ensaio de mobilidade em eletroforese) realizado usando a região de ligação dos genes <i>rv0405</i> , <i>rv0667</i> , <i>rv1116</i> e <i>rv3616c</i> ao motivo de ligação de <i>rv3405c</i>	52
Figura 4.7	Controle de qualidade do cDNA (ausência de DNA genômico contaminante)	53
Figura 4.8	Análise da expressão dos genes selecionados para o estudo por RT-qPCR	54
Figura 4.9	Amplificação dos alvos <i>rv0405</i> , <i>rv3405c</i> e <i>rv3406</i> por PCR a partir de amostras de cDNA	55
Figura 4.10	Curvas de amplificação (A) e de desnaturação (B) para o gene <i>sigA</i>	56
Figura 4.11	Curvas de amplificação (A a D) e desnaturação (E a H) para os genes <i>rv0405</i> , <i>rv0667</i> , <i>rv1116</i> , e	57

rv3616c

Figura 4.12	Curvas de amplificação (A) e desnaturação (B) do gene <i>rv3405</i>	58
Figura 4.13	Curvas de amplificação (A) e desnaturação (B) para o gene <i>rv3406</i>	59
Figura 4.14	Taxa de internalização das cepas recombinantes <i>MΔ05c</i> e <i>M::05c</i> .	60
Figura 4.15	Cinética de viabilidade intracelular dos BCGs recombinantes pós-infecção	61
Figura 4.16	Perfil representativo de colônias das cepas recombinante de <i>MΔ05c</i> e <i>M::5c</i> .	62
Figura 4.17	Cinética de viabilidade de macrófagos infectados com as cepas recombinantes <i>MΔ05c</i> e <i>M::05c</i> usando MOI de 1 (A) e 10 (B).	64
Figura 4.18	Cinética de produção das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e MIP-1 β usando MOI de 10 (B) a partir da técnica de citometria de fluxo	65
Figura 4.19	Cinética de produção da citocina IL-1 β usando MOI de 1 (A) e 10 (B) a partir da técnica de ELISA	66
Figura 4.20	Cinética de produção da citocina IL-6 usando MOI de 1 (A) e 10 (B) a partir da técnica de ELISA.	67
Figura 4.21	Cinética de produção da citocina TNF- α usando MOI de 1 (A) e 10 (B) a partir da técnica de ELISA.	68
Figura 4.22	Cinética de produção da citocina IL-10 usando MOI de 1 (A) e 10 (B) a partir da técnica de ELISA	69
Figura 4.23	Cinética de produção da citocina MIP-1 β usando MOI de 1 (A) e 10 (B) a partir da técnica de ELISA.	69
Figura 4.24	Expressão da proteína Rv3406	71

LISTA DE TABELAS

1	Iniciadores utilizados para identificação genética de BCGs	32
2	Iniciadores usados para amplificar as regiões alvo dos genes selecionados	35
3	Iniciadores usados para amplificar as regiões alvo dos genes de interesse e utilização em ensaios de RT-qPCR	37

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero <i>Mycobacterium</i>	1
1.2. Tuberculose	3
1.2.1. Epidemiologia	3
1.2.2. Resposta imunológica	7
1.2.3. A doença	11
1.3. Vacina BCG	13
1.4. Genoma de Micobactérias	17
1.5. Principais diferenças genéticas entre as cepas de BCG	20
1.6. Reguladores da família TetR	22
1.7. Rv3405c e Rv3406	23

2. OBJETIVOS **28**

3. METODOLOGIA

3.1. Culturas bacterianas	29
3.2. Quantificação do lotes-semente	29
3.3. Curva de crescimento das cepas recombinantes	30
3.4. Verificação genética das cepas de BCG	30
3.5. EMSA	33
3.6. Extração de RNA	35
3.7. RT-PCR	36
3.8. RT-qPCR	37
3.9. Cultura de células THP-1	38

3.10. Diferenciação das células THP-1 em macrófagos	39
3.11. Infecção por BCG	39
3.12. Viabilidade intracelular das cepas de BCG recombinantes	39
3.13. Viabilidade dos macrófagos em resposta à infecção com as cepas recombinantes	40
3.14. Dosagem de citocinas por citometria de fluxo	41
3.15. Dosagem de citocinas por ELISA	42
3.16. Avaliação da expressão de Rv3406 por <i>western blot</i>	42
4. RESULTADOS	
4.1. Obtenção dos lotes-semente das construções de BCGs recombinantes e análise de viabilidade bacteriana	45
4.2. Identidade genética das cepas de BCG	46
4.3. Avaliação das curvas de crescimento dos BCGs recombinantes em meio axênico	48
4.4. Mapeamento do regulon <i>rv3405</i>	49
4.5. Análise quantitativa da expressão gênica	52
4.6. Viabilidade intracelular dos BCGs recombinantes	59
4.7. Análise da morfologia das colônias após infecção de células THP-1	62
4.8. Perfil de viabilidade dos macrófagos em resposta à infecção	63
4.9. Perfil de secreção de citocinas	64
4.10. Expressão da proteína Rv3406	70
5. Discussão	72
6. Conclusões	86
7. Perspectivas	87
8. Referências Bibliográficas	88

1. Introdução

1.1. Gênero *Mycobacterium*

Bactérias do gênero *Mycobacterium* estão presentes em todo o planeta, com amplo espectro de virulência (Seeliger & Moody, 2016). Embora a maioria das espécies neste gênero sejam bactérias ambientais não-patogênicas, algumas espécies são altamente bem-sucedidas como patógenos intracelulares que infectam humanos e outros mamíferos, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* - os agentes causadores da tuberculose humana e bovina, respectivamente (Rue-Albrecht *et al.*, 2014).

As espécies do gênero *Mycobacterium* estão subdivididas em espécies de crescimento rápido e de crescimento lento, baseada na capacidade de desenvolver colônias em menos ou em mais de 7 dias, respectivamente. Espécies de crescimento rápido são geralmente oportunistas ou não-patogênicas, enquanto que as de crescimento lento incluem micobactérias patogênicas ao homem (Broset *et al.*, 2015).

Nesse grupo de micobactérias patogênicas destaca-se o *Mycobacterium tuberculosis*, um patógeno importante no que se refere ao número de casos de morte por infecção. Outras espécies capazes de causar doenças em humanos são, por exemplo, *M. leprae*, *M. ulcerans* e *M. avium* (Seeliger & Moody, 2016)

Como dito anteriormente, a tuberculose (TB) em humanos é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*), um dos membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), que compreende várias espécies e subespécies bacterianas relacionadas, incluindo *M. tuberculosis* e *M. africanum*

que são adaptados aos humanos, assim como várias formas adaptadas aos animais (Smith *et al.*, 2006) como, por exemplo, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. orygis*, *M. mungi*, *M. suricattae* (Coscolla & Gagneux, 2014).

MTBC são bactérias gram-positivas, álcool-ácido resistentes, transmitidas via aerossóis gerados por pacientes com TB pulmonar ativa (Coscolla & Gagneux, 2014).

As micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) exibem mais do que 99,9% de identidade em nível de nucleotídeos e sequências idênticas do RNA ribossomal 16S, mas diferem quanto ao tropismo pelo hospedeiro, fenótipos e patogenicidade (Brosch *et al.*, 2002). A espécie com a maior gama de hospedeiros é *M. bovis*, que é isolada principalmente a partir de bovinos, mas também pode ser responsável por surtos em animais selvagens. Além disso, *M. bovis* pode causar doenças em seres humanos, mas raramente em hospedeiros imunocompetentes (Rue-Albrecht *et al.*, 2014).

M. tuberculosis é considerado um dos patógenos mais antigos que emergiu durante a evolução humana. É possível entender que a pressão coevolutiva sobre essa relação patógeno-hospedeiro tenha sido fundamental no processo da doença. A partir desta perspectiva, a tuberculose latente revela uma convivência aparentemente pacífica envolvendo interações complexas e ainda pouco compreendidas entre o patógeno e o hospedeiro (Kaufmann, 2014).

Micobactérias se caracterizam pela inerente resistência aos antibióticos devido à sua taxa de crescimento extremamente lenta e à complexa composição lipídica da sua parede celular (Abuhammad, 2017).

M. tb é um patógeno intracelular que reside principalmente em fagócitos mononucleares, mas também em alguns fagócitos não-profissionais (Kaufmann, 2014), que desenvolveu, de forma bem-sucedida, estratégias para colonizar macrófagos alveolares e superar seus mecanismos bactericidas. Assim, ele se propaga no hospedeiro durante as fases iniciais da infecção na ausência de uma resposta imunológica organizada capaz de controlar a infecção (Cooper, 2009). *M. tb* escapa da resposta imunológica de forma que a infecção persista, mas, de forma simultânea, promove imunopatologia capaz de garantir a sua transmissão (Korb, Chuturgoon & Moodley, 2016).

1.2. Tuberculose

1.2.1. Epidemiologia

Em 1994, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1994) declarou a tuberculose uma emergência de saúde pública mundial, devido à ocorrência de cerca de 8 milhões de casos e 1,6 milhões de mortes.

Nos últimos dois séculos, mais de 1 bilhão de pessoas morreram de TB – mais do que varíola, malária, peste, influenza e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) juntos. A recente epidemia do vírus Ebola acometeu 30.000 pessoas e foi responsável por menos de 12.000 mortes; já a TB registra 180.000 novos casos por semana (Kaufmann, 2016). Esses dados revelam a gravidade da doença no cenário da saúde pública.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a tuberculose acomete milhões de pessoas a cada ano e, em 2015, foi uma das 10 maiores causas de morte em todo o mundo, situando-se acima do HIV/AIDS como uma das principais causas de morte por uma doença infecciosa. A melhor estimativa é que houve 1,8 milhão de mortes por TB em 2015, sendo 0,4 milhões de mortes resultantes de TB entre pessoas HIV positivas. Quanto ao número de casos, em 2015 havia 10,4 milhões de novos casos da doença (incluindo 1,2 milhão entre indivíduos HIV-positivos), dos quais 5,9 milhões entre homens, 3,5 milhões entre mulheres e 1,0 milhão entre crianças. De modo geral, 90% dos casos foram em adultos e 10% em crianças, e a proporção homem:mulher foi de 1,6:1.

Isto ocorre apesar do fato de que a maioria das pessoas que desenvolve tuberculose pode ser curada a partir de diagnóstico oportuno e tratamento correto (WHO, 2016). Esses números são extremamente elevados considerando que existem medidas para controle da doença, como tratamento com antibióticos e, especialmente, vacinação com *Mycobacterium bovis* BCG (Souza-Vasconcellos *et al.*, 2015).

Os 30 países com alto índice de TB representaram 87% de todos os casos estimados em todo o mundo. Os seis países que se destacaram pelo maior número de casos em 2015 foram (em ordem decrescente): Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão e África do Sul - em conjunto, representam 60% do total mundial. Destes, a China, a Índia e a Indonésia representaram sozinhas 45% dos casos em 2015. O Brasil figura entre os 30 países com maior carga da doença e também maior carga de co-infecção HIV/TB (WHO, 2016).

O número anual de casos de TB em relação ao tamanho da população variou amplamente, desde menos de 10 casos por 100.000 habitantes nos países de alta renda até 150-300 na maioria dos 30 países com alto índice de TB (Figura 1.1) (WHO, 2016).

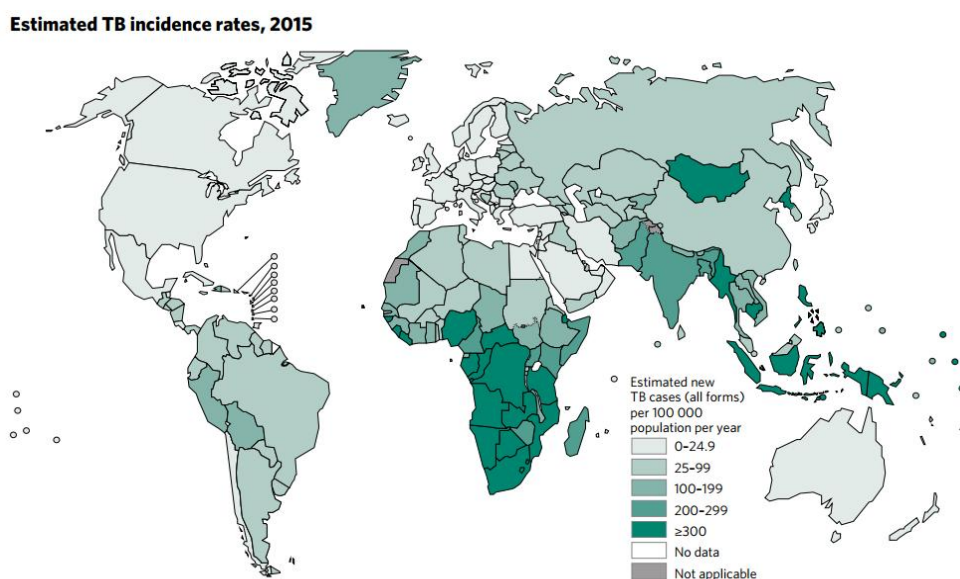


Figura 1.1: Número estimado de novos casos de tuberculose por 100.000 habitantes (WHO, 2016).

A tuberculose é a doença infecciosa com o registro mais antigo da história da humanidade (Cheon *et al.*, 2016). A tuberculose permaneceu esporádica até o século XVIII e foi a partir da Revolução Industrial que assumiu caráter epidêmico, devido ao aumento populacional e condições desfavoráveis de vida. Durante o século XX, a incidência diminuiu rapidamente nos países desenvolvidos devido à melhoria das condições de saúde, moradia e nutricionais. Com o advento da vacinação com o BCG e, mais tarde, do uso de drogas antimicrobianas (isoniazida, estreptomicina e rifampicina), a incidência reduziu ainda mais (Bañuls *et al.*, 2015).

A partir da década de 80, a incidência da tuberculose voltou a subir em função da epidemia causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), a precarização dos serviços de saúde nos grandes centros urbanos e o aparecimento da resistência às drogas (Bañuls *et al.*, 2015). Nos últimos 100 anos, a tuberculose provavelmente matou mais de 100 milhões de pessoas (Frieden *et al.*, 2003; Bañuls *et al.*, 2015). A presença do HIV prejudica a resposta imunológica do hospedeiro necessária para a contenção do *M. tb* durante a infecção latente e favorece a reemergência da doença. De forma recíproca, a TB é a principal causa de morte em indivíduos infectados pelo HIV, e o risco de desenvolver a doença ativa em indivíduos co-infectados aumenta para 10% ao ano (Kaufmann, 2014).

A doença reemergiu há algumas décadas como um crescente problema de saúde pública, principalmente pelo aparecimento de cepas multi- (MDR-TB) e extensivamente- (XDR-TB) resistentes às drogas, pela sinergia com a pandemia de HIV/AIDS e pelo aumento da pobreza (Neres *et al.*, 2015).

Em muitos países, a epidemia de TB continua sem diminuir, mesmo com a quimioterapia combinada, que envolve a administração de pelo menos quatro drogas. Uma importante dificuldade para a erradicação da TB é a rápida emergência de cepas resistentes às drogas, que tornou os tratamentos atuais ineficazes demandando enorme gerenciamento de pacientes em programas de controle da tuberculose. Além disso, o tratamento da TB resistente a drogas é caro e requer o uso de drogas altamente tóxicas, aumentando o aparecimento de efeitos colaterais (Black *et al.*, 2014).

M. tb é disseminado pelo ar quando uma pessoa infectada, através da tosse, espirro e/ou fala, elimina gotículas de saliva contendo o bacilo que,

lançadas no ar, podem ser inaladas por outra pessoa. Essas gotículas são pequenas o suficiente para alcançar as vias aéreas inferiores (Bañuls *et al.*, 2015). Os bacilos são inalados a partir destas gotículas na atmosfera que devem conter uma dose infectante estimada de um único bacilo (Korb, Chuturgoon & Moodley, 2016). As gotículas infecciosas são inaladas e se alojam nos alvéolos pulmonares onde, em seguida, as bactérias são fagocitadas por macrófagos alveolares, que iniciam uma cascata de eventos que pode resultar na contenção da infecção ou na progressão para a doença ativa. Apesar do risco de desenvolvimento de doença ativa variar de acordo com o tempo desde a infecção, idade e imunidade do hospedeiro, o risco de ativação estimado de doença para uma criança recém-infectada é de 10%, com cerca de metade desse risco ocorrendo nos primeiros 2 anos após infecção (Frieden *et al.*, 2003).

1.2.2. Resposta Imunológica

A tuberculose é classificada como uma doença inflamatória granulomatosa, na qual as células efetoras se acumulam no local da infecção para formar a característica de um tubérculo que, fisicamente, contém a infecção, inibe a replicação bacteriana e previne sua disseminação. Juntas, essas ações resultam em doença subclínica. No entanto, o granuloma também protege as bactérias do sistema imunológico, proporcionando um nicho para a sua sobrevivência. A latência é considerada uma característica marcante da imunidade protetora, atribuída à atividade coordenada e bem sucedida das células T CD4⁺ em cerca de 90% dos indivíduos infectados (Korb, Chuturgoon & Moodley, 2016).

O reconhecimento de micobactérias pelos macrófagos ocorre através da interação dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), tais como lipopolissacarídeos, várias lipoproteínas e glicolípídeos - lipoarabinomanana, por exemplo – com os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), tais como receptores do tipo *Toll* (TLR), que são expressos na superfície dos macrófagos alveolares e intersticiais, bem como células dendríticas presentes no local (Rue-Albrecht *et al.*, 2014).

Receptores do tipo *Toll* são expostos na superfície (TLR2 e TLR4) ou no interior (TLR9) de muitas células, inclusive macrófagos e células dendríticas. Estão classicamente envolvidos na ativação de resposta pró-inflamatória através da ativação de NF- κ B, mas também atuam através de reguladores negativos (TRIF, IRF e IRAK-M) (Schorey & Schelesinger, 2016). A sinalização via TLR dispara a ativação transcricional da pró-IL-1 β e pró-IL-18, que são processadas nas suas formas ativas pelos inflamossomos, e cujas funções pró-inflamatórias direcionam a resposta do hospedeiro para a inflamação (Huante *et al.*, 2016).

Alguns receptores, como receptores de manose e dectina-1, diferenciam entre cepas de micobactérias. Ativação por micobactérias não-patogênicas e atenuadas, mas não por *M. tb* H37Rv, aumenta a produção de TNF- α , RANTES e IL-6 pelos macrófagos. Ativação de dectina-1 inibe a replicação de BCG, mas não de *M. tb* em macrófagos humanos (Schorey & Schelesinger, 2016).

De acordo com a Figura 1.2., a natureza do reconhecimento do receptor presente em macrófagos e as vias de apresentação antigênica são

distintas durante os estágios da infecção e da doença. Além disso, a natureza da cepa infectante de *M. tb* também contribui para essa diversidade de respostas (Schorey & Schelesinger, 2016).

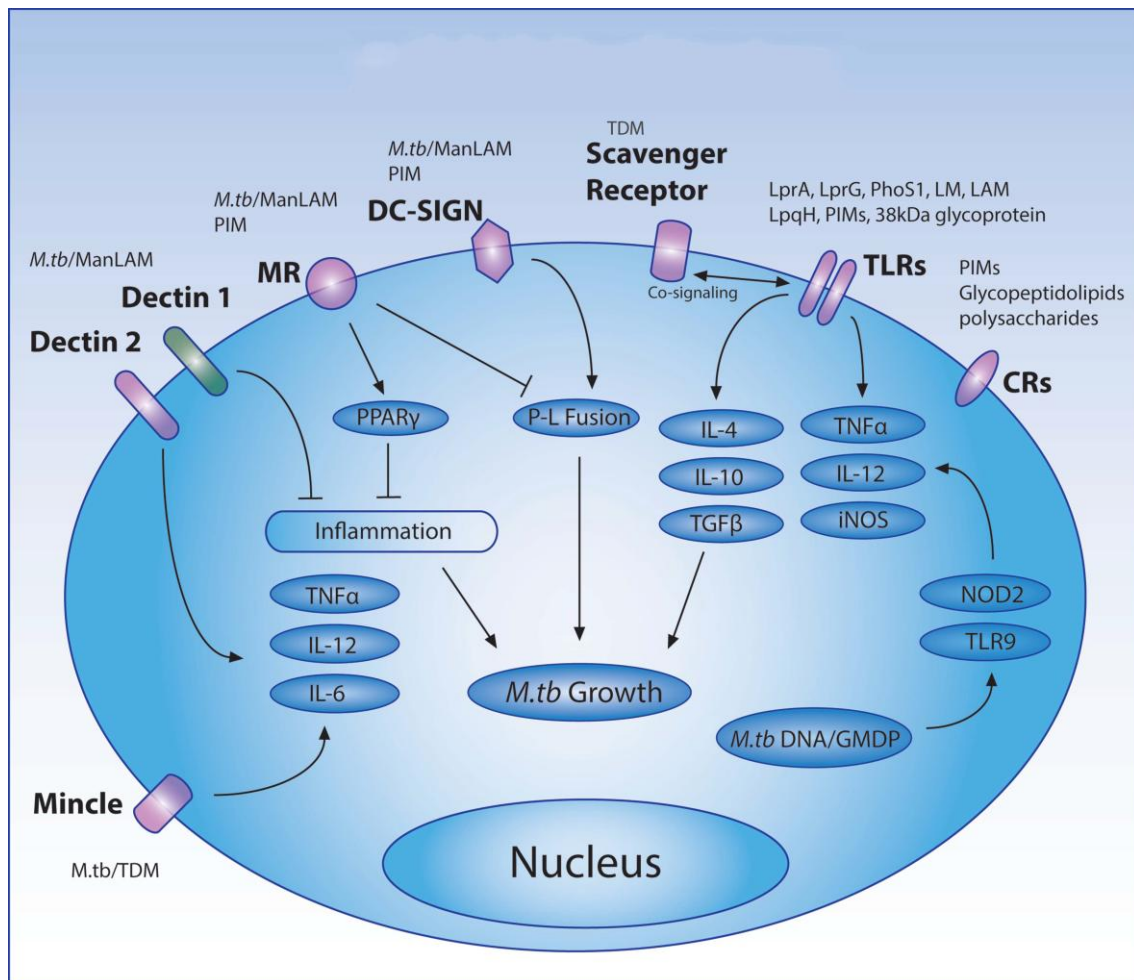


Figura 1.2. Receptores presentes nos macrófagos conhecidos pelo envolvimento com *M. tb* ou seus componentes. O reconhecimento macrófago-*M. tb* impacta na produção de citocinas, fusão fagossomo-lisossomo e inflamação. A participação de diferentes receptores resulta em resposta dos macrófagos que podem promover ou limitar a resposta imunológica do hospedeiro à infecção pelo *M. tb* (Schorey & Schlesinger, 2016).

Macrófagos servem como células imunológicas efetoras fundamentais na resposta imunológica inata do hospedeiro à infecção inicial através da secreção de citocinas inflamatórias e quimiocinas (Rue-Albrecht *et al.*, 2014).

Após o reconhecimento, macrófagos apresentam aos linfócitos o complexo antígeno-MHC I ou antígeno-MHC II para as células T CD8⁺ e

TCD4⁺, respectivamente. Linfócitos T primados ativam macrófagos capazes de induzir vias de sinalização, resultando na ativação de NF-κB, citocinas e quimiocinas que promovem resposta imunológica do tipo T_H1, caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN-γ a partir de células T CD4⁺ e a lise dos macrófagos infectados por células T CD8⁺ citotóxicas. IFN-γ induz a atividade microbicida dos macrófagos infectados e aumenta a expressão de moléculas de classe I e II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) necessárias para a apresentação de antígenos micobacterianos na superfície celular de macrófagos para células CD8⁺ e células T CD4⁺, respectivamente. Estes mecanismos podem levar à erradicação do patógeno e da infecção ou a contenção da infecção através da formação de granulomas (Rue-Albrecht *et al.*, 2014), que resulta em infecção crônica associada com crescimento lento e não-replicativo das bactérias e patologia potencialmente progressiva (Korb, Chuturgoon & Moodley, 2016).

O sucesso da infecção e o desenvolvimento da forma pulmonar da TB dependem de 4 etapas sucessivas: fagocitose do bacilo, multiplicação intracelular, manutenção da infecção na fase latente e, finalmente, o desenvolvimento da doença pulmonar ativa. Essas etapas podem progredir para diferentes cenários clínicos: cura espontânea, doença, infecção latente e reativação (Bañuls *et al.*, 2015).

As micobactérias patogênicas desenvolveram mecanismos para escapar do sistema imunológico, facilitando a sua sobrevivência e replicação dentro dos macrófagos do hospedeiro. Estes mecanismos incluem inibição da maturação do fagossomo, necessária para destruição do patógeno e a apresentação de antígenos, evasão da apoptose de macrófagos e ativação da

necrose dos macrófagos, o que facilita a libertação de bacilos e favorece a disseminação da infecção para outras células. Foi também demonstrado que cepas virulentas de *M. tb* preferencialmente infectam macrófagos permissivos à evasão das ações microbicidas através da máscara de lipídeos associados à superfície celular (MMAFs) (Rue-Albrecht *et al.*, 2014).

Um fator fundamental para o sucesso do *M. tb* como patógeno é a sua habilidade para sobreviver e persistir nas células hospedeiras dentro de granulomas por períodos longos de tempo, o que resulta na disseminação bacilar intra- e inter-hospedeiros (Shi, Eugenin & Subbian, 2016).

1.2.3. A doença

O resultado entre infecção e doença tem sido atribuído às variáveis ambientais e do hospedeiro. Fatores genéticos humanos parecem influenciar a susceptibilidade à TB. Por outro lado, fatores ambientais como superpopulação e ventilação precária podem contribuir para a doença (Coscolla & Gagneaux, 2014).

O diagnóstico da TB tem evoluído rapidamente. Apesar da cultura permanecer como padrão para diagnóstico e teste de susceptibilidade às drogas, os ensaios de biologia molecular baseado em DNA têm se tornado largamente disponíveis e permitem diagnóstico rápido e avaliação da susceptibilidade à drogas. Esses métodos facilitam o início imediato do tratamento (Horsburg, Barry & Lange, 2015).

A TB pode ser tratada por quimioterapia, mas o esquema é complexo e de longa duração, exigindo três a quatro drogas dadas ao longo de um período de pelo menos 6 meses. A baixa adesão e o abandono do tratamento têm

levado ao aumento do número de cepas de *M. tb* resistente a fármacos. Estima-se que 50 milhões de indivíduos portam cepas de *M. tb* multidroga-resistentes (MDR) dos quais quase 50% desenvolve a TB-MDR anualmente (Abuhammad, 2017). Multidroga resistência é definida como a TB resistente a, pelo menos, duas das mais importantes drogas de primeira linha, rifampicina e isoniazida (Sotgiu, Sulis & Matteelli, 2017). O tratamento da TB-MDR é ainda mais complicado pela dificuldade causada pelos efeitos adversos, incluindo psicose e convulsões (Abuhammad, 2017).

Para agravar o quadro, casos de TB extensivamente resistente às drogas (TB-XDR) têm aumentado em taxas alarmantes e foi relatada por 105 países em 2015 (Abuhammad, 2017), o que torna o gerenciamento da doença mais difícil (Bañuls *et al.*, 2015). Cepas extremamente resistente às drogas (XDR) são definidas como MDR acrescidas de resistência a uma fluoroquinolona e qualquer uma das três drogas injetáveis (amicacina, canamicina e capreomicina) (Sotgiu, Sulis & Matteelli, 2017). As infecções causadas por bactérias resistentes às drogas foram responsáveis por cerca de 190.000 mortes em 2014, e o tratamento dessas infecções é um dos maiores desafios da terapia anti-TB.

Mesmo após mais de 130 anos da identificação do agente etiológico da TB e 94 anos após a vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin) ter sido introduzida para uso clínico, a TB permanece como uma das doenças infecciosas mais letais (Zhang *et al.*, 2016).

1.3. Vacina BCG

De acordo com Zhang *et al.* (2016), a vacina BCG é a vacina mais usada no mundo, já tendo sido administrada em mais de 90% das crianças no mundo; cerca de 120 milhões de doses de BCG são administradas anualmente em mais de cem países (Copin *et al.*, 2014).

A vacina BCG foi desenvolvida no início do século passado pelos pesquisadores Albert Calmette e Camille Guérin e é uma das vacinas mais antigas e mais comumente administradas no mundo (Ritz & Curtis, 2009).

Em 1908, Calmette e Guérin iniciaram uma cultura, em meio de batata contendo bile e glicerina, de uma estirpe virulenta de *M. bovis* obtida de boi com tuberculose. Em 1913, eles fizeram um ensaio de vacinação em bovinos, mas o início da primeira guerra mundial interrompeu os estudos. A subcultura da cepa virulenta foi continuada e após cerca de 230 subculturas realizadas ao longo de 11 anos, eles obtiveram um bacilo tuberculoso que não produzia doença progressiva quando injetado em porcos, coelhos, gado ou cavalos (Sakula, 1983).

Devido à facilidade de administração, capacidade de penetração no epitélio intestinal de animais e bebês e pela capacidade de induzir a imunidade específica, em 1921 Calmette escolheu a via oral para a administração da vacina BCG em humanos (revisto por Lagranderie *et al.*, 2000).

Ainda em 1921, a vacina BCG foi usada pela primeira vez em humanos. Calmette administrou 3 doses de 2 mg logo após o nascimento de uma criança cuja mãe era tuberculosa (Succi, 1995). Após 6 meses da imunização, a criança não tinha nenhum sinal da doença (Lagrange, 1998).

Entre 1921 e 1924 aproximadamente outras 300 crianças foram vacinadas pelos mesmos pesquisadores (Assis, 1932).

A partir da atenuação, a cepa original foi distribuída para muitos países e regiões do mundo, onde foram mantidas por repetidas subculturas levando ao surgimento de diferentes subcepas fenotipicamente diferentes, e originando muitas cepas descendentes (Ritz & Curtis, 2009; Zhang *et al.*, 2013) (Figura 1.3).

Sem processos de liofilização, congelamento ou a produção dos lotes-semente até 1960, a propagação de BCG através de diversas passagens sob diferentes condições laboratoriais resultou na geração de cepas filhas de BCG com diferentes características morfológicas, bioquímicas e imunológicas (Abdallah *et al.*, 2015). O processo de liofilização, introduzido na década de 1960, permitiu o estoque dos lotes-sementes. Até esse momento, a subcepa BCG Pasteur, por exemplo, tinha sido submetida a 1173 passagens (Copin *et al.*, 2014).

As diferentes “vacinas BCG” produzidas no mundo compreendem uma família heterogênea de sub-cepas (Behr *et al.*, 1999; Mostowy *et al.*, 2003). Atualmente, 14 sub-cepas de BCG são usadas no mundo como vacinas contra a tuberculose (Abdallah *et al.*, 2015).

O registro de segurança dessas vacinas é exemplar. Mais de três bilhões de indivíduos foram imunizados com BCG sem grandes efeitos colaterais. A estabilidade do BCG e a ausência de reversão à virulência sugerem que um evento genético irreversível, como deleção gênica, teria contribuído para o processo de atenuação original (Pym *et al.*, 2002).

Essa deleção se refere a um segmento de DNA de 9,5 kb, conhecido como RD1, que está ausente em todas as subcepas de BCG, mas presente em todas as cepas virulentas e clínicas de *M. bovis* e *M. tuberculosis*. A reintrodução da RD1 em BCG resultou na repressão de pelo menos 10 proteínas e na expressão induzida de pelo menos 3 proteínas, produzindo um perfil de expressão de proteína quase idêntico ao de *M. bovis* virulento e *M. tuberculosis*. Estes dados sugerem que o BCG perdeu o controle regulatório sobre alguns *loci* e é consistente com o envolvimento dos produtos gênicos codificados pela RD1 nos mecanismos regulatórios globais associados à virulência (Mahairas *et al.*, 1996). Hoje se sabe que a RD1 codifica os componentes do sistema de secreção do tipo VII, ESX-1, responsável pela secreção de ESAT-6 e CFP-10, cujos genes também estão na RD1 (Simeone *et al.*, 2009) (Figura 1.3).

Muitos estudos com cepas de BCG têm mostrado mudanças a nível genômico, e estudos de genômica comparativa têm revelado regiões de diferença (RD), incluindo também polimorfismos de base única (SNP), sequências de inserção (IS6110), deleções e duplicações. Algumas das subcepas perderam regiões genômicas que afetam o conteúdo antigênico, alterando potencialmente a eficácia protetora. Assim, as cepas de BCG podem ser sub-classificadas em cepas antigas (mais próximas do BCG original obtido por Calmette e Guérin), como BCG Rússia, Tokyo, Moreau, Birkhaug e Suíça que mostram deleções cromossômicas menores do que as cepas recentes, como BCG Prague, Glaxo, Danish, Tice, Frappier, Connaught, Phipps e Pasteur (Abdallah *et al.*, 2015) (Figura 1.3).

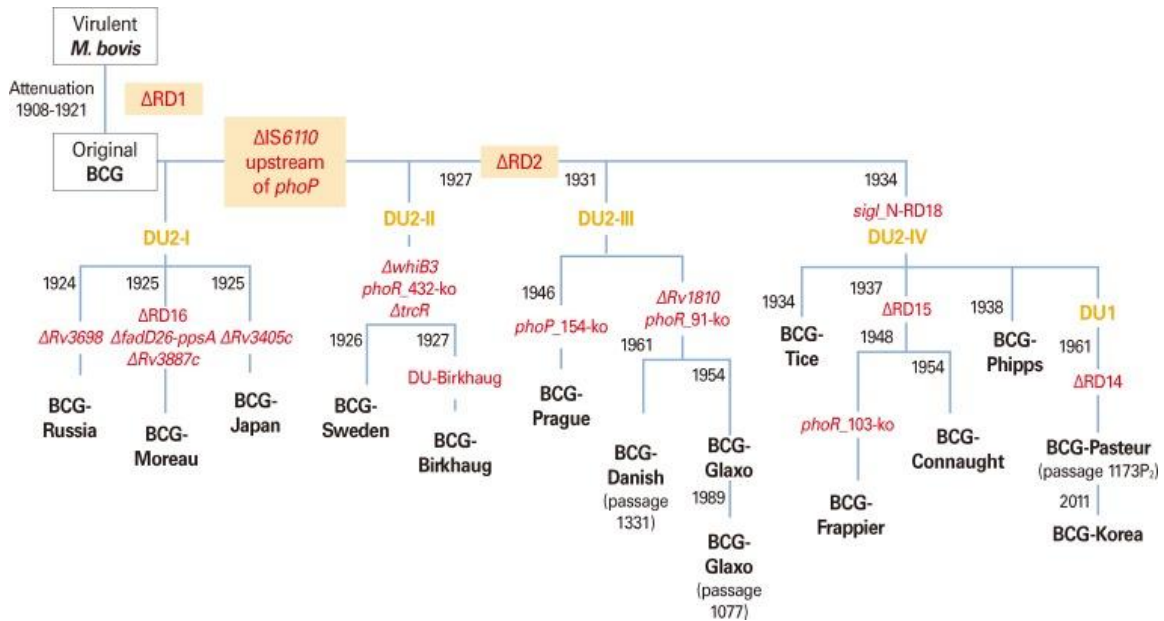


Figura 1.3: Genealogia das vacinas BCG. A cepa original de BCG, mantida no Instituto Pasteur em Lille, na França, produziu centenas de cepas-filhas. A partir de 1924, culturas do BCG foram distribuídas pelo Instituto Pasteur para laboratórios em todo o mundo. Em 1926, pelo menos 34 países receberam culturas do Instituto Pasteur. Em 1927, outros 26 países receberam culturas de BCG (Joung & Ryoo, 2013).

Meta-análise dos dados de 14 ensaios prospectivos e 12 estudos de caso-controle sobre a eficácia do BCG indica que a vacinação com BCG reduz significativamente o risco da TB em média em 50% (Brewer, 2000).

Apesar da vacina ser eficaz na prevenção da TB em crianças, a sua eficácia contra TB pulmonar em adultos varia de 0-80% (Copin *et al.*, 2014). As razões para a variação na eficácia da vacina BCG são desconhecidas, mas existem algumas hipóteses sobre os fatores que podem contribuir para a variabilidade. Esses fatores incluem diferença entre as cepas vacinais utilizadas, pré-exposição da população às micobactérias ambientais, diferenças nutricionais e genéticas entre as populações e diferenças dentre os isolados clínicos de *M. tb*. A eficácia da vacina também depende da localização geográfica. Existem relatos de redução da eficácia da vacina em populações que vivem em áreas rurais próximas à linha do Equador (Burl *et al.*, 2010).

Além desses fatores, a exposição prévia a micobactérias não-tuberculosas bloquearia ou mascararia a resposta imunológica induzida pela vacinação com BCG (Abdallah *et al.*, 2015).

Uma preocupação com o BCG se refere à segurança em indivíduos imunocomprometidos. A doença causada pela disseminação do BCG (BCGíte) tem sido observada, após a vacinação, em crianças infectadas pelo HIV, e o risco supera o benefício de prevenção da doença. Em 2007, a OMS reviu a sua recomendação e declarou que a infecção pelo HIV é uma contraindicação para o uso do BCG (Tran *et al.*, 2016). Como resultado, a política atualmente recomendada pela OMS é que crianças sabidamente infectadas pelo HIV, mesmo assintomáticas, não devem ser imunizadas com BCG (Zhang *et al.*, 2016).

1.4. Genomas de Micobactérias

O primeiro genoma micobacteriano completamente sequenciado e disponível para a comunidade científica foi o de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. O sequenciamento revelou 4.411.529 pb, com aproximadamente 4.000 genes que codificam para proteínas (Cole *et al.*, 1998), dos quais 25% (cerca de 1019 genes) foram classificados como hipotéticos ou sem função atribuída (Lew *et al.*, 2011). Cerca de 65,9% do genoma é constituído por guanina (G) e citosina (C), e esse alto conteúdo G + C tem como consequência a alta frequência com que o códon de iniciação GTG é encontrado no genoma (35%), além de composição diferenciada do proteoma, onde há a prevalência de

aminoácidos codificados por códons ricos em G + C, como alanina, glicina, prolina e arginina (Cole *et al.*, 1998).

Aproximadamente 8% do genoma codifica para proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, o que ressalta a importância dessas moléculas para o estilo de vida do *M. tb* como um patógeno intracelular que se protege com um envelope celular rico em lipídeos, glicolipídeos, lipoglicanas e policetídeos (Cole *et al.*, 2008). O genoma de *Escherichia coli*, por exemplo, codifica cerca de 50 enzimas envolvidas em metabolismo lipídico ao passo que o genoma de *M. tb* contém pelo menos 250 genes que codificam para essas enzimas (Côtés *et al.*, 2008).

Como já mencionado anteriormente, a vacina BCG surgiu a partir da atenuação *in vitro* (230 vezes passagens entre 1908 e 1921) de uma estirpe virulenta de *M. bovis*. A partir de 1924, o BCG foi distribuído para vários países em todo o mundo, levando à sua diversificação e geração de cepas geneticamente distintas. Análises comparativas do genoma, (através de técnicas de hibridização, microarranjo e sequenciamento completo dos genomas), levaram à descoberta de inúmeros polimorfismos de sequência, incluindo deleções e duplicações, bem como polimorfismos de nucleotídeo único entre as diferentes cepas de BCG (Zhang *et al.*, 2016).

A genômica comparativa revelou duas grandes duplicações de 29 e 36 kb (DU1 e DU2, respectivamente) em BCG Pasteur (Brosch *et al.*, 2000) que parecem ter surgido independentemente, assim como sua presença e/ou variação do tamanho entre as diferentes subcepas. DU1 parece ser restrita à BCG Pasteur enquanto que DU2 foi detectada em todas as cepas de BCG

testadas (Brosch *et al.*, 2007). Com base nesses estudos, as cepas de BCG foram separadas em diferentes grupos. Por exemplo, uma duplicação (região denominada de DU2) ocorre em todas as cepas BCG examinadas até agora. As cepas de BCG podem ser divididas em quatro grupos principais baseados nas formas de DU2 encontradas: grupo I (BCG-Rússia, -Japão e -Moreau), II (BCG-Suécia e -Birkhaug), III (BCG-Danish, -Praga, -Glaxo, e -China) e IV (BCG-Phipps, -Tice, -Frappier e -Pasteur) (Zhang *et al.*, 2016).

O agrupamento gênico das diferentes cepas de BCG é geralmente consistente com os registros históricos da distribuição da vacina. Por exemplo, as estirpes BCG de grupos DU2 I e II foram distribuídas antes de 1927 (as cepas iniciais) e as cepas dos grupos III e IV foram distribuídas após 1927 (as cepas tardias). As cepas dos grupos III e IV também exibem uma deleção na Região de Diferença 2 (RD2) (Zhang *et al.*, 2016).

Uma hipótese sobre o que contribui para a eficácia protetora altamente variável da vacina, observada em ensaios clínicos, se refere à heterogeneidade das cepas de BCG. Apesar de serem referidas como BCG, existe um número de subcepas que têm sido usadas em diferentes programas de vacinação. Todavia, essa hipótese ainda não foi formalmente testada devido à escassez de estudos clínicos comparando diferentes cepas de BCG (Tran *et al.*, 2016).

As diferenças genéticas - SNPs, deleções e duplicações - entre as cepas têm sido bem documentadas, baseado em um número de estudos, incluindo o sequenciamento completo dos genomas. Apesar das diferenças genéticas e bioquímicas entre as cepas de BCG estar bem estabelecida, se e como essas diferenças afetam a eficácia das vacinas contra TB é largamente desconhecido e permanece questão de debate (Tran *et al.*, 2016).

A atual epidemiologia global da TB e a emergência das cepas resistentes a drogas têm resultado em esforços para melhorar o BCG ou desenvolver uma vacina totalmente nova contra a doença. Uma vez que as cepas de BCG também variam na expressão de proteínas, composição lipídica e comportamento em animais de laboratório e humanos, a compreensão das diferenças genéticas pode fornecer subsídios para a definição dos determinantes da imunidade protetora (Behr & Small, 1999).

1.5. Principais diferenças genéticas entre as cepas de BCG

As mais importantes diferenças genéticas entre *M. tb* e as cepas de BCG são deleções cromossômicas, como a região de diferença 1 (RD1) (Pym *et al.*, 2002).

A principal razão atribuída para a atenuação primária do BCG quando comparado com o *M. bovis* é a perda do *locus* RD1, região deletada em todas as cepas filhas e que afeta o sistema de secreção de proteínas ESX-1 (Abdallah *et al.*, 2007). No entanto, a reintrodução dessa região em BCG não restaura completamente a virulência, sugerindo que outras regiões gênicas também estão envolvidas na atenuação (Leung *et al.*, 2008; Abdallah *et al.*, 2015).

A região RD1 é uma fonte importante de epítomos de células T humanas, a maioria deles presentes na proteína ESAT-6. ESAT-6 está envolvida na promoção dos mecanismos de escape do fagossomo, apoptose de macrófagos, disseminação célula-célula de cepas patogênicas e, conseqüentemente, na propagação do *M. tb* (Broset *et al.*, 2016).

ESAT-6 pertence a uma família de 22 proteínas cujos genes ocorrem em 11 *loci* em *M. tb* H37Rv. Três *loci* ESAT-6 são variáveis entre as espécies que pertencem ao complexo *M. tb* (RD1, RD5 e RD8). Os produtos ausentes são membros das famílias de proteínas PE, PPE e ESAT-6, que são características das micobactérias em particular (PE e PPE) e actinobactérias em geral (ESAT-6). Apesar da ausência de sinais de secreção óbvios, a proteína ESAT-6 (Rv3875) é um componente abundante do filtrado de cultura e um antígeno imunodominante para células T que induz potentes respostas T_h1; outro componente abundante é a proteína CFP-10, codificada pelo gene vizinho (Rv3874) (Pym *et al.*, 2002).

Pym *et al.* (2002) observaram que a cepa BCG complementada com a região RD1 (BCG::RD1) foi mais virulenta, como evidenciado pela taxa de crescimento nos pulmões e baço de camundongos SCID e também por um aumento do grau de esplenomegalia em relação aos controles. Outros órgãos, como o fígado e rim, apresentaram sinais de inflamação e abscessos. O exame histológico de pulmões de camundongos SCID infectados com BCG revelou vias aéreas normais e muito poucos bacilos.

Outras diferenças incluem a deleção de Rv3698, característica do BCG Rússia. Tanto na BCG Japão como na BCG Rússia, a região promotora do gene *phoP* contém um elemento IS6110 que também pode ter implicações para a virulência. BCG Pasteur carece dessa inserção, resultando na expressão de *phoP*. Comparado com as cepas BCG Rússia e Japão, o BCG Pasteur suprimiu três segmentos cromossômicos adicionais: RD2, n-RD18 e RD14, e tem um número de mutações pontuais que levam a fenótipos de perda de função (Di Pietrantonio *et al.*, 2011)

RD16 é uma deleção encontrada apenas na cepa BCG Moreau quando comparada com o genoma de *M. tuberculosis* H37Rv e a outras cepas BCG. É uma região com 7608 pares de bases contendo 6 fases abertas de leitura (*rv3400-rv3405c*) (Honda *et al.*, 2006).

1.6. Reguladores da família TetR

TetR define uma grande família de reguladores da transcrição que contém um domínio de ligação ao DNA hélice-volta-hélice conservado e um domínio C-terminal ligante do regulador. Estes reguladores geralmente servem como repressores e são amplamente distribuídos entre as bactérias (Yang *et al.*, 2015). Os reguladores da família TetR são frequentemente repressores e se ligam ao DNA para impedir a transcrição na ausência de um ligante. A ligação de uma molécula efetora na região C-terminal provoca mudanças conformacionais na proteína, resultando na liberação do regulador do DNA (Balhana *et al.*, 2015).

A função mais frequentemente caracterizada de proteínas da família TetR é a regulação de bombas de efluxo e transportadores, envolvidos na resistência a antibióticos e tolerância a compostos químicos tóxicos. Por exemplo, TetR de *E. coli* controla a expressão do gene que codifica uma bomba de efluxo de tetraciclina responsável pela resistência a 16 drogas (Yang *et al.*, 2015).

Membros da família TetR ligam-se aos promotores de genes de bomba de efluxo e são regulados por uma infinidade de ligantes que podem causar

mudanças na conformação da proteína, impedindo a ligação, aliviando a repressão da transcrição (Yang *et al.*, 2015).

Os genomas *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG apresentam um grande grupo de reguladores da família *TetR*. No entanto, os fatores de transcrição que podem se ligar diretamente às drogas anti-TB de primeira linha permanecem não caracterizados, assim como a rede molecular através do qual as bactérias respondem às drogas (Yang *et al.*, 2015).

1.7. Rv3405c e Rv3406

A deleção da região RD16, específica de BCG Moreau, removeu os genes *rv3401-rv3404*, truncando e fusionando as sequências *rv3400* e *rv3405c*. Em *M. tb*, *rv3405c* codifica um regulador transcricional da família *TetR* e o resultado desse truncamento é um gene quimérico que mantém a sequência N-terminal do *rv3405c* (incluindo o domínio putativo de ligação ao DNA) fusionado à parte do *rv3400*, codificado na fita oposta (Galvão *et al.*, 2014) (Figura 1.4).

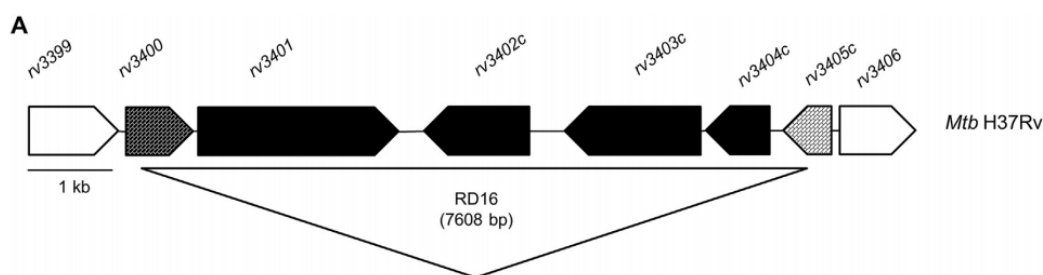


Figura 1.4: A região *rv3405c* em *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG Moreau. A região RD16 do genoma H37Rv de *M. tuberculosis* compreende 7608 pb que estão ausentes em *M. bovis* BCG Moreau. A exclusão trunca os ortólogos de *rv3400* e *rv3405c*. (Galvão *et al.*, 2014).

O gene *rv3405c* é divergentemente expresso do gene vizinho *rv3406* que codifica uma sulfato-éster dioxigenase dependente de ferro e de α -acetoglutarato (Neres *et al.*, 2015). Um único palíndromo

(TGTAGTCAtcTGACTIONA) foi encontrado entre *rv3405c* e *rv3406*, e poderia representar a sequência de ligação do DNA de *Rv3405c* (Galvão *et al.*, 2014).

O genoma de *M. tb* codifica um total de 9 sulfatases: 1 sulfatase tipo II (*Rv3406*), 3 sulfatases tipo III (*Rv2407*, *Rv3796* e *Rv3762c*) e 5 sulfatases do tipo I (*AtsA*, *AtsB*, *AtsD*, *AtsF* e *AtsG*) (Sogi *et al.*, 2013)

Rv3406 foi inicialmente anotada no genoma de *M. tb* como uma taurina dioxigenase (Cole *et al.*, 1998), uma classe de enzimas que usa o mesmo cosubstrato das alquil sulfatases do tipo II, mas clivam ponte sulfonato $R-SO_3^-$ (liberando sulfito) ao invés de clivar ligação C-O (Sogi *et al.*, 2013) (Figura 1.5).

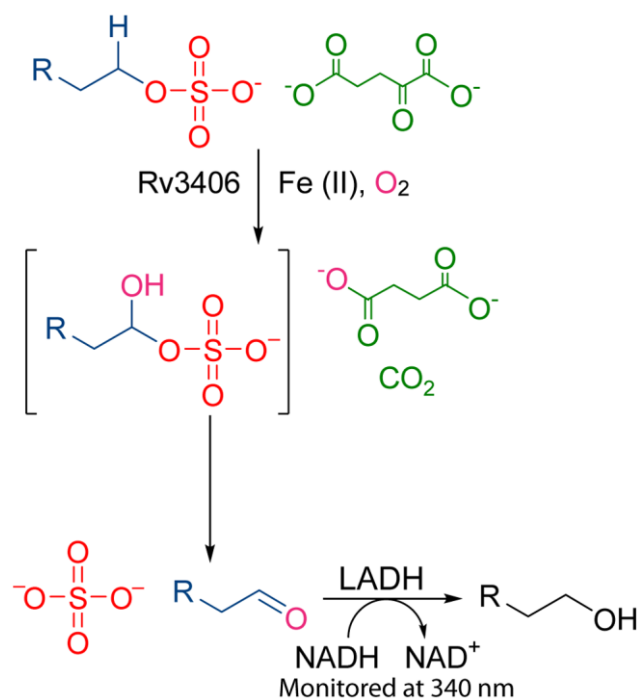


Figura 1.5: Reação catalisada por *Rv3406*. O carbono alfa de um alquil sulfato é oxidado pela *Rv3406* na presença de α-cetoglutarato e converte em aldeído e sulfato, liberando em CO₂ e succinato (Sogi *et al.*, 2013).

Sulfatases catalisam a quebra de ésteres de sulfato e estão envolvidas em diversos processos biológicos. A dessulfatação de biomoléculas tem sido descrita na sinalização celular, atividade hormonal e remodelação tecidual em

animais, assim como na remoção e metabolismo de sulfatos. No caso de bactérias patogênicas, sulfatases são enzimas conhecidas por desempenhar funções adicionais na colonização de tecidos e manutenção da infecção em tecidos de órgãos como pulmão, estômago, trato gastrointestinal inferior e sistema nervoso central (Sogi *et al.*, 2013).

Para determinar se Rv3406 funciona como um alquil sulfatase do tipo AtsK, Sogi e colaboradores (2013) expressaram a proteína recombinante em *E. coli* e testaram a atividade em um painel de substratos sulfatados. O estudo concluiu que alquilsulfatos de cadeia média são bons substratos para Rv3406, particularmente sulfato de 2-etil-hexilo (2-EHS). Além disso, foi determinada a estrutura por cristalografia da *apo* Rv3406 a 2,5 Å, confirmando assim que a sua dobradura e sítio ativo são estruturalmente semelhantes a AtsK de *Pseudomonas putida*. Finalmente, demonstraram que Rv3406 é essencial para o crescimento de *M. tb* com 2-EHS como única fonte de enxofre, indicando que a Rv3406 tem atividade alquil-sulfatase em *M. tb* vivo e pode auxiliar na aquisição de sulfato.

Sulfatases do tipo II são dioxigenases não heme-ferro dependentes que oxidam ligação alfa C-H para éster sulfato usando α -cetoglutarato (α KG) e oxigênio como substratos. Assim sulfatases tipo II são as únicas dentro da superfamília das sulfatases que clivam ligações R-OSO₃⁻ (Sogi *et al.*, 2013) .

Depois de décadas de inatividade na descoberta de fármacos contra a tuberculose, foi desenvolvida em 2012 a primeira droga de TB nova aprovada desde os anos 1960, chamada Bedaquilina, trazendo esperança para muitos pacientes com MDR-TB. Atualmente, algumas moléculas estão em estudos

pré-clínicos, clínicos de fase II e III, mas ensaios ainda precisam ser feitos para resolver divergências encontradas nos ensaios clínicos (Neres *et al.*, 2015).

Neres *et al.* (2015) relataram a descoberta de uma família de quinoxalinas com atividade anti-tuberculose, seguindo uma triagem de uma biblioteca química contra *M. tb* em fase de replicação. Essa triagem levou ao composto Ty38c (3-((4-metoxibenzil)amino)-6-(trifluorometil) quinoxalina-2-ácido carboxílico) que é ativo contra *M. tb* intra- e extracelular. O sequenciamento do genoma inteiro e a análise bioinformática de quatro mutantes independentes (TRC1-TRC4), resistentes ao Ty38c, revelou que cada mutante possuía um polimorfismo de base única diferente (SNP) ou a deleção de uma única base no gene *rv3405c*.

Para entender esse mecanismo de resistência causado pela Rv3406, Neres e colaboradores (2015) expressaram e purificaram essa proteína e sua atividade foi avaliada a partir do consumo de oxigênio usando α KG e 2-EHS como substrato. Ao final dos experimentos, determinaram que Ty38c poderia substituir α KG e 2-EHS e ser metabolizado pela enzima; no entanto, Rv3406 foi enzimaticamente ativa na presença de Ty38c e 2-EHS (na ausência de α KG), mas não quando incubado com Ty38c e α KG na ausência de EHS, mostrando que Rv3406 pode usar Ty38c como substrato.

Trabalhos anteriores do grupo (Galvão *et al.*, 2014) demonstram que Rv3405c é um repressor transcricional que controla a expressão tanto de *rv3405c* como de *rv3406*; a ausência da atividade repressora de Rv3405c em BCG Moreau, devido à deleção genômica RD16, leva à perda do controle transcricional e consequente expressão constitutiva de Rv3406 em BCG Moreau.

Os possíveis impactos do truncamento da *rv3405c* e o acúmulo da proteína Rv3406 foram analisados, neste trabalho, no contexto de infecção de macrófagos (THP-1) com cepas de BCG portadoras (*M::05c*) ou não (*MΔ05c*) do gene *rv3405c* funcional de BCG Pasteur, a fim de observar esses efeitos sob dois aspectos: 1. Na resposta da bactéria ao ambiente intracelular e; 2. Na resposta da célula hospedeira à infecção com esses BCGs.

2. Objetivos

Objetivo geral:

Avaliar o impacto funcional do repressor transcricional Rv3405c em BCG Moreau no contexto da infecção *in vitro*.

Objetivos específicos:

1. Avaliar o impacto da deleção *rv3405c* na viabilidade das cepas recombinantes (M Δ 05c e M::05c) em cultura axênica e no ambiente intracelular;
2. Verificar outros alvos putativamente regulados por *rv3405c* através de EMSA e do perfil de expressão gênica nas cepas recombinantes por ensaios de RT-PCR e RT-qPCR;
3. Comparar o comportamento das células THP-1 em resposta à infecção com as duas cepas recombinantes através da análise de viabilidade celular e secreção de citocinas;
4. Avaliar a expressão de Rv3406 no ambiente intracelular.

3. Metodologia

3.1. Culturas bacterianas

As cepas de *M. bovis* BCG Moreau foram cultivadas em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 (Difco™) enriquecido com 10% de albumina, dextrose, catalase (ADC – Albumina, Dextrose, Catalase), 0,05% Tween 80 (Sigma) e 0,2% glicerol (Sigma); as culturas de BCGs recombinantes (BCG Moreau Δ 05c e BCG Moreau::05c) (Galvão *et al.*, 2014) foram acrescidas de canamicina (50 mg/mL). As culturas foram mantidas sob agitação constante e à temperatura de 37°C por aproximadamente 3 semanas, com passagem semanal usando a diluição 1:10. Ao atingir a densidade ótica (DO_{600nm}) de aproximadamente 1,0 (que corresponde a fase exponencial do crescimento), o cultivo foi interrompido, foram feitas alíquotas de 1 mL com concentração final de 15% de glicerol (Sigma) e os lotes-semente estocados a -70 °C. Os lotes-semente foram usados para as contagens de CFU, para o posterior ensaio de infecção de células THP-1, e para confirmação da identidade genética das cepas (ver abaixo).

3.2. Quantificação dos lotes-semente

Os lotes-semente foram quantificados através da determinação de unidades formadoras de colônias (*colony forming units*, CFU). Alíquotas do lote-semente foram descongeladas por 10 minutos à 37°C, centrifugadas por 10 minutos a 16.000 x g e o sobrenadante descartado. O sedimento bacteriano

foi ressuspenso em 1 mL de meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco™) acrescido de Tween 80, glicerol e ADC e os grumos de bactérias foram mecanicamente dissociados através de sucessivas passagens em seringa de 27,5 G X ½". A partir dessa suspensão bacteriana foram feitas diluições seriadas. O equivalente a 100 µL de cada diluição foi plaqueado em meio 7H10 (Difco™) suplementado com ADC e canamicina e as placas mantidas em estufa a 37°C. As colônias foram quantificadas 28 dias após o plaqueamento.

3.3. Curva de crescimento das cepas recombinantes

Três alíquotas (lotes-semente) de cada cepa recombinante foram descongeladas, centrifugadas e o sedimento bacteriano ressuspenso em 5 mL de meio 7H9 acrescido de ADC, 0,05% Tween-80 e canamicina. Essa cultura foi mantida por 7 dias à 37 °C sob agitação. Após, essa cultura foi expandida para volume de 25 mL e após mais 7 dias para o volume de 50 mL. Após esse período de expansão das culturas, as mesmas foram padronizadas para OD_{600nm} = 0,2 em volume final de 60 mL de meio. Em intervalos de 24 horas, a densidade óptica de 1 mL de cada cultura foi avaliada em espectrofotômetro (600 nm) por um período de 14 dias.

3.4. Verificação genética das cepas BCG

A cada lote preparado, a identidade genética das cepas de BCG foi verificada através de PCR com iniciadores específicos que permitem diferenciar as cepas usadas no estudo.

Lotes-semente das culturas foram descongelados e centrifugados por 10 minutos a 13.000 x g. O sedimento bacteriano foi ressuspensão em 1 ml de tampão de lise para micobactérias (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM KCl, 5 mM EDTA) e transferido para tubos contendo pérolas de zircônio (0,1mm de diâmetro). A lise foi feita em *bead-beater* (Biospec Products INC) com 3 ciclos de agitação de 1 minuto na velocidade média e 4 ciclos de 15 segundos na velocidade alta. Entre os ciclos os tubos foram mantidos por intervalos de 1 minuto em gelo. Ao final, o material foi centrifugado a 15.000 xg por 5 minutos e o sobrenadante congelado a -20 °C.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µL, utilizando material obtido após a lise, *kit* Master Mix PCR (Promega), 200 nM de cada iniciador específico (F e R) e 5 µL de DNA genômico de cada cepa.

Os iniciadores específicos usados na identificação genética estão descritos na Tabela 1 e uma figura com o esquema das regiões onde os oligonucleotídeos anelam nos genomas de BCG Pasteur, BCG Moreau e no vetor pUS977 estão na figura 3.1:

Tabela 1: Iniciadores utilizados para identificação genética de BCGs

Número iniciador	Iniciador	Sequência (5' - 3')
66	RT Rev <i>rv3405c</i>	GCGTGCTGGGTCTG
96	<i>rv3405c-KpnI</i> For	GGGGTACCTGCTGGCGTCCTCAATGAATGG
97	<i>rv3405c-HindIII</i> Rev	CCCAAGCTTTTCAGTGCGGTTCCAGGATCCG
98	pUS For	TACGAGCCACACAGCGCCCG
99	pUS Rev	ACGTTTCCCGTTGAATATGGCT
122	pUS972 seq For	AAGCAGACAGTTTTATTG
123	pUS972 seq Rev	TTAGACCCGTTAGACCCCT

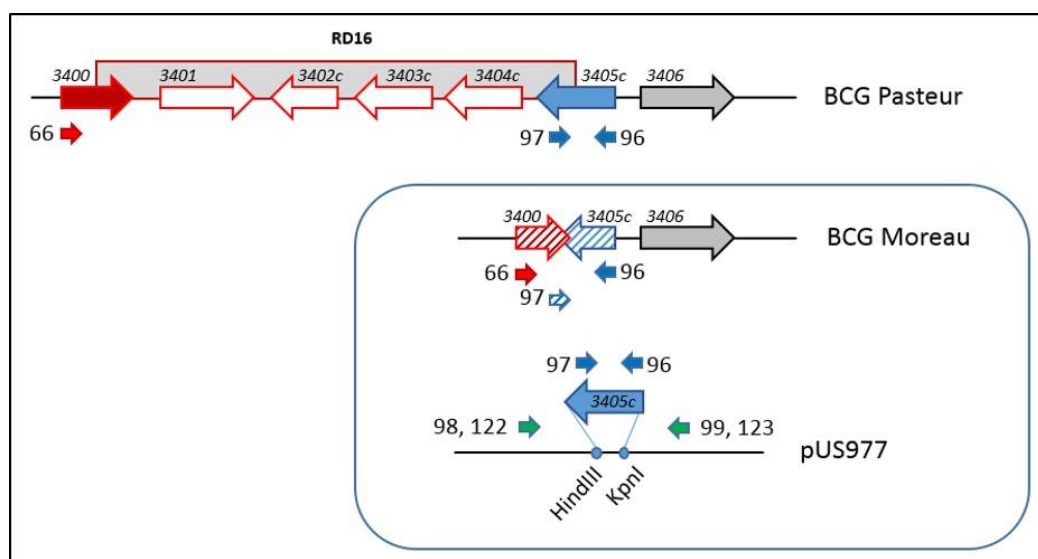


Figura 3.1. Localização dos oligonucleotídeos usados nos ensaios de identificação genética. Oligonucleotídeos foram desenhados para regiões específicas dos genomas de BCG Pasteur e BCG Moreau, assim como para o plasmídeo usado na construção das cepas recombinantes.

A ciclagem usada nesses experimentos está descrita abaixo:

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
94°C	3 minutos	1
94°C	30 segundos	} 30
55°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	4 minutos	1
4°C	∞	1

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5x. Após a corrida, o DNA foi corado com brometo de etídeo, descorado em água destilada, visualizado e fotografado sob luz ultravioleta no equipamento GelDoc XR (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

3.5. EMSA

Para avaliar a existência de interação entre a proteína estudada (Rv3405c) e o motivo de ligação da sequência de DNA da região intergênica *rv3405-rv3406* foram realizados ensaios eletroforéticos de mobilidade (EMSA). Um dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação desta região foi conjugado à biotina, possibilitando a detecção do fragmento amplificado.

Para o ensaio, um gel de poliacrilamida 5% foi preparado em tampão TBE 0,5X. O gel foi pré-corrido por 30 minutos a 100 V. Utilizamos o kit LightShift™ EMSA Optimization & Control (Pierce) para preparo das reações

de ligação. Para um volume final de 15 μ L foram utilizados: 1,5 μ L 10x *Binding Buffer*, 0,75 μ L 50% glicerol, 0,75 μ L poli dI-dC, 0,1 μ L de DNA biotilado a 0,4 ng/ μ L, H₂O Milli-Q estéril e proteína recombinante purificada Rv3405c, produzida em nosso laboratório, em diferentes concentrações (4 μ M / 2 μ M / 200 nM / 20 nM / 2 nM / 0,4 nM). O tempo de incubação da reação foi de 45 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente adicionamos Loading Buffer (1x – Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 0,002% de azul de bromofenol e 10% de glicerol), as amostras foram aplicadas no gel e corridas em 0,5x TBE a 100V à temperatura ambiente, até que o azul de bromofenol chegasse à metade do gel. O material foi então transferido para membrana Hybond N⁺ (GE Healthcare) em equipamento Mini Transblot (Bio-Rad) e a ligação proteína-DNA foi revelada pela utilização do LightShift[®] Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante.

Na Tabela 2 estão listados os oligonucleotídeos usados para amplificar as regiões alvo dos genes possivelmente regulados por *rv3405c* e o tamanho dos fragmentos esperados.

Tabela 2: Oligonucleotídeos usados para amplificar as regiões alvo dos genes selecionados

Alvo	Forward	Reverse	Tamanho (bp)
<i>rv3405c-rv3406</i>	ACGGTAATCAGATCTGTCAT	TTGCCGGACGCGTAGTCATC	101
<i>rv0405</i>	AATTATTCCTGAGTCATTAA	TATCCCAAATAGTAGACTTT	116
<i>rv0667</i>	GCCAGCTAGCGCCGATATCC	AAGTGGCGGGTGAGGTGGGC	115
<i>rv1116</i>	AGTGTACCCAAACCAATCCT	ATCCGTATGGCAGCGCCGTG	119
<i>rv3616c</i>	CGTGCAATGCAGAACCAAGG	CCTTGGTTCTGCATTGCACG	116

3.6. Extração de RNA

Culturas axênicas das cepas de BCG recombinantes foram crescidas até o volume de 25 mL. Esse volume foi distribuído em microtubos para centrífuga quando as culturas atingiram a DO_{600nm} entre 0,8 e 1,2. Após, as culturas foram centrifugadas e ao sedimento bacteriano acrescentado 350 μ L de RNA Wiz fornecido pelo fabricante do *kit* RiboPure™ Bacteria (Ambion®). Esses sedimentos foram então estocados à $-80^{\circ}C$ até o momento do uso.

Amostras foram descongeladas, transferidas para tubos contendo pérolas de zircônio e as bactérias lisadas em Bead-Beater com três ciclos de 1 minuto na velocidade média com intervalo de 1 minuto em gelo e com 4 ciclos de 15 segundos na velocidade alta com intervalo de 1 minuto em gelo.

Após a etapa de lise, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante transferido para novo tubo. A partir dessa etapa, as amostras foram tratadas de acordo com os protocolos do fabricante. Brevemente, ao

sobrenadante foi adicionado 0,2 volume de clorofórmio e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após, as amostras foram centrifugadas e a fase aquosa transferida para novo tubo. A esse tubo foi acrescido 0,5 volume de etanol 100%. A amostra foi transferida para coluna (fornecida pela kit) e lavada por centrifugação 2 vezes com 700 µL de tampão de lavagem. O RNA foi então eluído em 30 µL de tampão de eluição. A concentração de RNA das amostras foi avaliada em Nanodrop e após isso, realizado o tratamento com DNase (Ambion) para eliminar contaminação por DNA. A ausência de contaminação com DNA foi confirmada através de PCR diretamente sobre o RNA. Amostras negativas para DNA foram usadas para sintetizar a fita complementar do DNA (cDNA).

3.7. RT-PCR

Para a síntese de cDNA, 80 ng de RNA foram usados. A síntese de cDNA ocorreu em reação que incluía oligonucleotídeos randômicos e RNasin (Promega) e *SuperScript III* (Life Technologies) (RT+) seguindo as recomendações do fabricante. Para avaliar a contaminação por DNA genômico, uma amostra de RNA foi usada para síntese de cDNA sem a presença da enzima Transcriptase Reversa (RT-).

As reações de RT-PCR foram realizadas usando 5 µL do cDNA obtido das amostras denominadas RT+ diluído 10 vezes, Master Mix 2x (Promega) e oligonucleotídeos para os alvos de interesse (Tabela 3) em reação com volume final de 25 µL.

Tabela 3: Oligonucleotídeos para amplificar os genes de interesse e utilização em ensaios de RT-PCR:

Alvo	Forward	Reverse	Tamanho (bp)
<i>sigA</i>	CTCGACGCTGAACCAGACCT	AGGTCTTCGTGGTCTTTGTC	148
<i>rv0405</i>	CGCATATCGAGTGTCAATCA	TAGGATTATCCCAAACGGCC	156
<i>rv0667</i>	TCCTCGAATAACTCCGTACCC	TTGACATCACCCCGCTCGGC	157
<i>rv1116</i>	GCGGCTTAGAAGCCGGCGCG	GTTGGCGGAACTGCTGGCTC	160
<i>rv3405c</i>	ACTACGCGTCCGGCAACC	GTGCGGTTCCAGGATCCGGG	567
<i>rv3406</i>	ATCATCACGCCGATCAACTC	GCAGCACTTCGAATAACACC	392
<i>rv3616c</i>	CTGGGGGATTGGAATACCCAA	AATTCACGTGGTTGCGGTTT	155

O resultado do RT-PCR foi analisado em eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 0,5x. Após a corrida, o DNA foi corado com brometo de etídeo, descorado em água destilada, visualizado e fotografado sob luz ultravioleta no equipamento GelDoc XR (Bio-Rad).

3.8. RT-qPCR

A partir das amostras obtidas acima (RT+), realizamos experimentos de PCR em tempo real, com o objetivo de quantificar os transcritos associados à presença do repressor transcricional *rv3405c*. Esses experimentos de PCR quantitativo (RT-qPCR) foram realizados usando ABI Prism 7500 *Fast System* (Applied Biosystems), e reação em volume final de 20 µL, contendo 25 ng de cDNA por reação, 10 µL de *Master Mix Power SYBR Green 2x* (Applied

Biosystems) e 200 ng/uL de cada um dos oligonucleotídeos para os alvos selecionados. As condições de ciclagem de PCR foram: um primeiro passo a 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 1 min. Para verificar a especificidade dos iniciadores, as curvas de fusão foram geradas após os 40 ciclos. Os resultados foram analisados no 7500 Software v2.0.6.

3.9. Cultura de células THP-1

Células THP-1 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Milton Ozório Moraes (Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz – RJ) e foram mantidas em meio RPMI-1640 (Sigma), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Sigma), penicilina e estreptomicina (PESS) 100 U/mL (Sigma), a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

As células foram mantidas até a 3ª passagem com troca de meio a cada 3 dias. Na terceira passagem, as células foram centrifugadas a 450 xg por 10 minutos com temperatura entre 4 °C e 10 °C. Após, as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas e diferenciadas (protocolo descrito no item a seguir) em placas de 24 poços (2x10⁵ células/ poço) para ensaios de viabilidade bacteriana, em placas de 96 (3,2 x 10⁴ células/poço) para ensaios de viabilidade celular e dosagem de citocinas ou em garrafas de cultura de células de 25 cm³ (2x10⁶), para ensaios de avaliação de expressão de proteínas.

3.10. Diferenciação das células THP-1 em macrófagos

Para os ensaios de infecção, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e a viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão por coloração com 0,4% azul de Tripán. Posteriormente, foram estimuladas com 200 nM de acetato de forbol-miristila (PMA) (Sigma-Aldrich) em meio RPMI acrescido de 10% de SFB pré-aquecido para a diferenciação em macrófagos (mdTHP-1). Após 48 h de estímulo, as células foram lavadas para a retirada do PMA e então adicionado meio RPMI acrescido de SFB 10% pré-aquecido por 48 h, com troca diária.

Os mdTHP-1 foram então infectados por *M. bovis* BCG em multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1 por 4 h a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂.

3.11. Infecção por BCG

Lotes das cepas recombinantes foram descongelados e centrifugados por 1 minuto a 13.000 xg. Os sobrenadantes foram desprezados e as amostras ressuspensas em meio 7H9 acrescido de ADC e canamicina.

Após, as bactérias foram mecanicamente dissociadas através de sucessivas passagens em seringa de 27,5 G X ½” e usadas para infectar as células usando multiplicidade de infecção de 10:1 ou 1:1 (bactérias:célula).

3.12. Viabilidade intracelular das cepas de BCG recombinantes

Para os ensaios de viabilidade intracelular das cepas BCG foram utilizadas 2 X 10⁵ células por poço, em placas de 24 poços (Nunc), onde as células foram diferenciadas como descrito anteriormente.

O lote semente de bactéria usado para infectar as células THP-1 diferenciadas em macrófagos foram processados como descrito no item 3.2.

Ao final do tempo de infecção, o meio de cultura foi removido e as células lavadas duas vezes com meio RPMI / SFB 10%, a fim de retirar as bactérias que não foram fagocitadas. A viabilidade intracelular das cepas BCGs foi avaliada através de uma cinética de tempo, que compreendia os tempos de 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção. Nos tempos selecionados, os mdTHP-1 infectados foram lisados com 0,05% SDS (Venkataswamy *et al.*, 2012). As células lisadas, assim como as bactérias, foram recolhidas e centrifugadas por 10 min a 16.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 1 mL de meio líquido 7H9 / Tween 80 / Glicerol / ADC. A partir dessa suspensão bacteriana foram feitas diluições seriadas conforme descrito no item 3.2.

3.13. Viabilidade dos macrófagos em resposta à infecção com as cepas recombinantes

Para avaliar a viabilidade celular dos mdTHP-1 durante a infecção das cepas recombinantes $3,2 \times 10^4$ células THP-1 foram plaqueadas em triplicata em microplacas de 96 poços pretas com fundo chato (Greiner®) e diferenciadas em macrófagos, como descrito no item 3.6. As células foram infectadas com MOI de 10:1 e 1:1 com as cepas recombinantes, como descrito anteriormente (item 3.7). Células não infectadas e células tratadas com Triton X-100 0,01% foram usadas como controle negativo e controle de morte, respectivamente. A cada 24 horas após a infecção durante o período total de 96 horas, às células era adicionado 100 μ L do composto PrestoBlue™ (Invitrogen) diluído 10 vezes.

A placa era mantida em estufa 37 °C com 5% de CO₂ por 1 hora e após esse tempo, o resultado era avaliado no equipamento FlexStation nos comprimentos de onda de excitação de 560_{nm} e de emissão 590_{nm}.

PrestoBlue™ consiste de um indicador fluorescente de cor azul escura (resazurina) que é convertido em um composto fluorescente vermelho (resofurina) por células metabolicamente ativas.

3.14. Dosagem de citocinas por citometria de fluxo

Em placas de 96 poços com fundo em “U”, células THP-1 foram plaqueadas na concentração de 3,2x10⁴ células por poço. Essas células foram diferenciadas em macrófagos e infectadas com os BCGs recombinantes conforme descrito anteriormente (itens 4 e 5, respectivamente). Os sobrenadantes dos macrófagos não-infectados e infectados foram coletados em gelo em diferentes tempos pós-infecção (6, 24, 48, 72 e 96 horas), centrifugados por 2 minutos a 4°C e armazenados a -80°C.

Através do Kit *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Soluble Protein Flex Set* as concentrações de IL-1β (cat. 558279), IL-6 (cat. 558276), IL-8 (cat. 558277), MIP-1β (cat. 558288) e TNF-α (cat. 558273) foram determinadas. Brevemente, a curva-padrão foi preparada contendo as *beads* para cada uma das citocinas e às amostras foi adicionado o conjunto de *beads* para cada citocina e incubamos por 1 hora. Após esse tempo, incubamos a curva-padrão e as amostras com o detector do fluoróforo (PE) por 2 horas. Depois, as amostras foram lavadas por centrifugação a 200 x g por 5 minutos com tampão de lavagem, o sobrenadante foi descartado e ressuspenso em

tampão de lavagem. Antes da passagem das amostras pelo citômetro de fluxo FACSCalibur (BD), o equipamento foi ajustado e as amostras foram passadas.

3.15. Dosagem de citocinas por ELISA

A produção de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α) e da quimiocina MIP-1 β foi avaliada por ensaio de ELISA. O ensaio foi realizado a partir de amostras de sobrenadantes provenientes das infecções dos macrófagos com as cepas recombinantes usando os kits comerciais da R&D systems (cat n.: IL-1 β : DY201; IL-6: DY206; IL-10: DY217B; TNF- α : DY210; MIP-1 β : DY271), seguindo as recomendações do fabricante. Os limites de detecção das citocinas fornecidos pelos *kits* são: IL-1 β = 3.91 - 250 pg/mL; IL-6 = 9.38-600 pg/mL; IL-10 = 31.2-2000 pg/mL; TNF- α = 15.6-1000 pg/mL; e MIP-1 β = 15.6-1000 pg/mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Spectra Max 190) a 450_{nm}.

3.16. Avaliação da expressão de Rv3406 por *Western Blot*

Para avaliar a expressão da proteína Rv3406 pelas cepas de BCG recombinantes após a infecção, dmTHP-1 infectados foram lisados com 0,05% SDS no tempo de 96 horas. As bactérias recuperadas foram lisadas e as proteínas precipitadas pela adição de ácido tricloroacético (TCA) na concentração final de 17%, seguido de incubação a -20 °C por 10 minutos e centrifugação por 10 minutos a 16.000 xg. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 300 μ L de acetona gelada contendo 1% trietanolamina (TEA) e duas vezes com 300 μ L de acetona 100% gelada. O sedimento final foi

ressuspensão em 10 µL de tampão 8M de uréia e 2% de CHAPS ([-(3-colamidolpropil dimetilamonio)-1-propanosulfonato]).

As proteínas foram dosadas usando NanoDrop e uma quantidade de 50 µg de proteína foi misturada ao tampão de amostra de proteína 1x para um volume final de 15 µL. A mistura foi em seguida aquecida a 100 °C por 5 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em géis 15% SDS-PAGE de 7 centímetros em tampão de corrida (Laemmli, 1970) a 200 volts empregando o sistema MiniProtean (Bio-Rad). O marcador de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope (Bio-Rad). As proteínas foram transferidas para membrana de Nitrocelulose (Hybond) através de sistema de transferência Semi-seco (Semi-dry - Bio-Rad) por 30 minutos a 15V. Após a transferência, as membranas foram coradas com o corante reversível Mem Code (Pierce) para visualização das proteínas transferidas e captura de imagens com o densitômetro GS-800 (BioRad).

Após, as membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com leite desnatado 10% em TBS Tween 20 0,05% por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação e incubadas com o anticorpo primário anti-Rv3406 (1:5000) por 16 horas a 4 °C. Após, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS (1M Tris-HCl, pH 7,5; 87g NaCl; qsp 1L de água Milli-Q) e 3 vezes por 5 minutos com TBS acrescido de 0,1% de Tween-20. A seguir as membranas foram incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado com peroxidase (1:10.000; Pierce). As membranas foram novamente lavadas como descrito anteriormente

e a revelação foi realizada usando o kit SuperSignal (Pierce), seguindo as instruções do fabricante.

4. Resultados

4.1. Obtenção dos lotes-semente das construções de BCGs recombinantes e análise de viabilidade bacteriana:

A partir da Coleção de Bactérias do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática (LAGFB/ IOC), uma alíquota estoque de cada cepa, BCG Moreau e BCG Moreau complementada com o gene *rv3405c* selvagem (denominadas *MΔ05c* e *M::05c*, respectivamente). Alíquotas dessas construções foram avaliadas quanto ao número de unidades formadoras de colônias a partir do plaqueamento em três diluições (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) em meio 7H10 acrescido de ADC e canamicina (50 µg/mL). Após cerca de 30 dias, o número de colônias e a morfologia das mesmas foram analisados.

As Figuras 4.1A e 4.1B mostram a forma rugosa das colônias de *MΔ05c* e *M::05c*. Essa rugosidade é característica das colônias de BCG e não foram observadas diferenças morfológicas entre as cepas. A contagem das unidades formadoras de colônia revelou viabilidade de 2×10^6 células/mL para ambas as cepas.

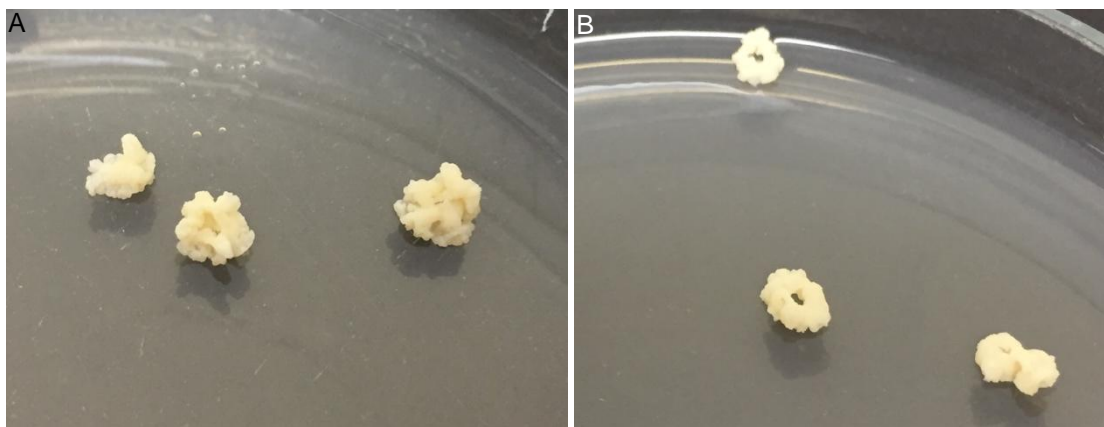


Figura 4.1: Morfologia das colônias M Δ 05c e M::05c. As Figuras 1A e 1B apresentam a morfologia das colônias das construções M Δ 05c e M::05c, respectivamente. Estoques das 2 cepas recombinantes foram usados para plaqueamento em meio 7H10 acrescido de ADC e canamicina. As amostras foram plaqueadas em 3 diferentes diluições e após 30 dias, o número e a morfologia das colônias foram analisados.

4.2. Identidade genética das cepas de BCG

Para confirmar a identidade genética das construções de BCGs recombinantes M Δ 05c e M::05c, oligonucleotídeos foram desenhados para regiões específicas e utilizados na amplificação de amostras oriundas das culturas dos BCGs (Figura 4.2).

Analisando conjuntamente o esquema e o resultado do PCR no gel de agarose, podemos observar que em BCG M Δ 05c (portadora do vetor vazio) os oligonucleotídeos 98+99 e 122+123 anelam no vetor pUS977 gerando fragmentos de 395 bp e 382 bp, respectivamente; os oligonucleotídeos 66+96 anelam na região genômica truncada e produzem um fragmento de 448 bp. Na cepa complementada com *rv3405c* (M::05c), os oligonucleotídeos 98+99 mostram um amplicon de 831 bp e o par de oligonucleotídeos 122-123 passam a gerar um fragmento de 818 bp (indicando a presença do inserto). Os oligonucleotídeos 96+97, que anelam em *rv3405c*, mostram um fragmento de 640 bp, correspondente ao inserto *rv3405c* clonado no vetor pUS977. O perfil

de bandas encontradas quando usamos como controle positivo apenas o vetor (pUS977), confirma a identidade genética da cepa MΔ05c. Os oligonucleotídeos 66+96 em BCG Moreau, usado também como controle, revelam a presença da região truncada *rv3400-rv3405c* (448 bp) e os oligonucleotídeos 96+97 não geram bandas em BCG Moreau uma vez que anelam no gene *rv3405c*, que está truncado nessa cepa.

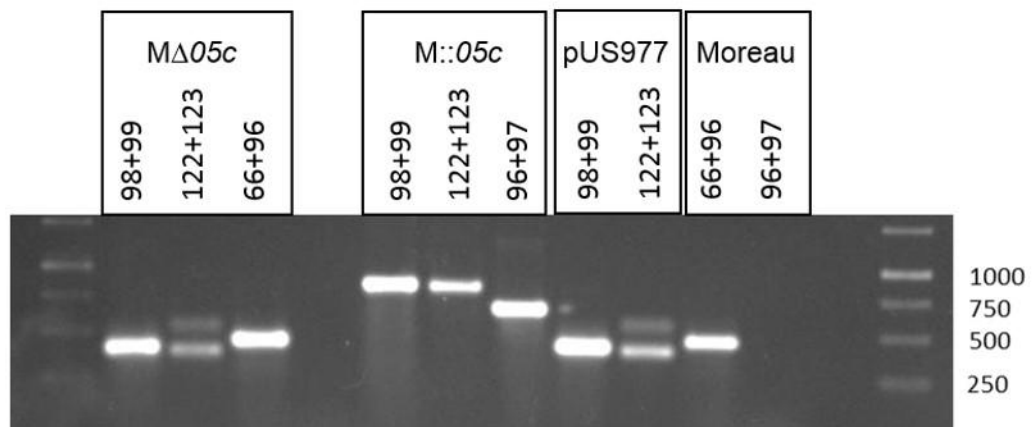
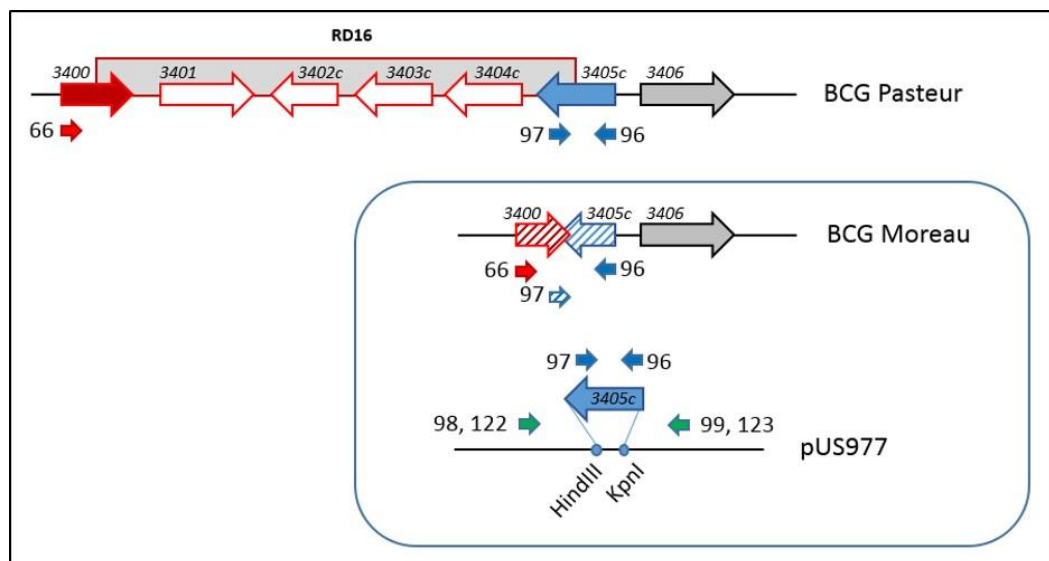


Figura 4.2: Identidade genética dos BCGs recombinantes. O painel superior esquematiza a posição dos oligonucleotídeos utilizados para caracterizar as cepas recombinantes. No esquema podemos observar a região genômica RD16 intacta em BCG Pasteur e perdida em BCG Moreau, o que levou ao truncamento dos genes *rv3400-rv3405c*, e o vetor pUS977 utilizado para a complementação com o gene funcional *rv3405c* de BCG Pasteur.

4.3. Avaliação das curvas de crescimento dos BCGs recombinantes em meio axênico

Para compreender se a presença do repressor transcricional codificado pelo gene *rv3405c* interfere na taxa de crescimento dos BCGs recombinantes em meio axênico, alíquotas de lotes-semente das cepas recombinantes foram descongeladas, centrifugadas e ressuspensas em 5 mL de meio líquido 7H9 acrescido de 10% ADC, canamicina (50 µg/mL) e 0,05% de Tween 80, sendo incubadas a 37 °C sob agitação por 1 semana. Após esse tempo, essas culturas foram expandidas para volume de 50 mL e mantidas por mais 1 semana.

A partir dessa cultura, foram feitos 3 novos inóculos, para cada construção, com uma DO_{600nm} de 0,2 padronizada em um volume final de 60 mL de cultura e mantidas à 37 °C sob agitação. A cada 24 horas, a DO_{600nm} era avaliada, por um período total de 14 dias.

Comparando o crescimento das duas cepas de BCG, nossos resultados indicaram que houve diferença significativa a partir de 96 horas (Figura 4.3). A cepa Moreau portadora do vetor vazio ($M\Delta05c$; representante da cepa Moreau) apresentou uma maior taxa de crescimento do que a cepa $M::05c$ (cepa complementada).

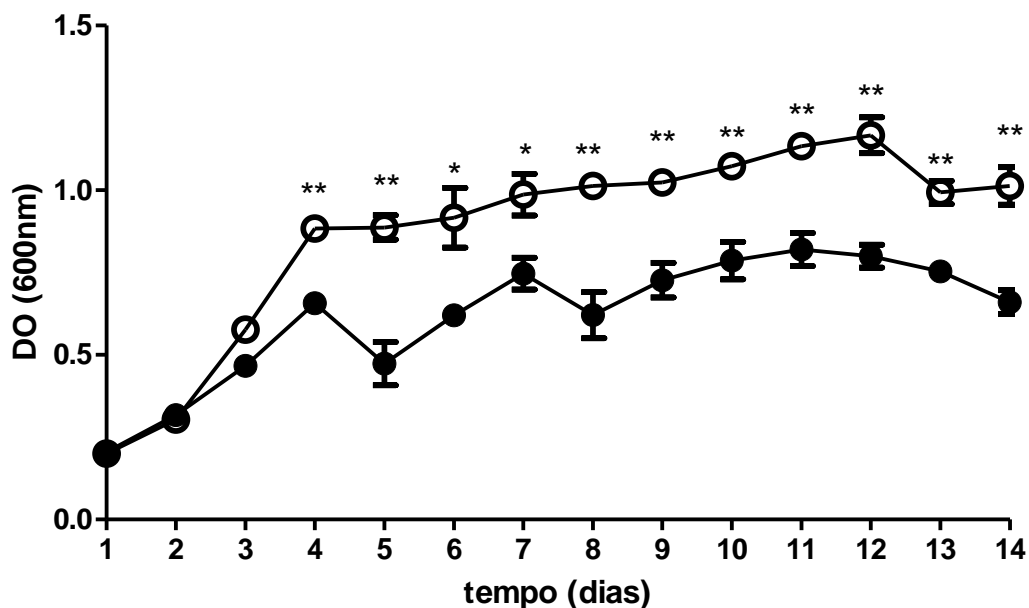


Figura 4.3: Comparação do perfil de crescimento das cepas recombinantes MΔ05c e M::05c em meio axênico. Círculos brancos (○) representam a cepa MΔ05c enquanto os círculos pretos (●) representam a cepa M::05c. Os dados representam as médias das triplicatas biológicas +/- DP. Análise estatística: Teste t = p<0,05; ** p < 0,01. N=3

4.4. Mapeamento do regulon *rv3405c*

Minch e colaboradores (2014), através da técnica de ChIPSeq, identificaram 5.400 regiões de ligação entre DNA e proteínas reguladoras de *M. tuberculosis*, incluindo o fator transcricional Rv3405c. Baseado nesses dados, selecionamos 4 alvos identificados neste estudo como regiões de ligação da proteína Rv3405c. Os alvos selecionados foram: *rv0405*, *rv0667*, *rv1116* e *rv3616c*.

Trabalhos prévios do laboratório levaram à identificação de uma sequência palindrômica (TGTAGTCA--TGACTACA) conservada na região intergênica entre *rv3405c-rv3406* em várias espécies de micobactérias (Galvão *et al.*, 2014), possível “motivo” de DNA para ligação do repressor transcricional codificado por *rv3405c*

As 4 regiões de DNA selecionadas a partir do trabalho de Minch e colaboradores (2014) como ligantes de Rv3405c foram alinhadas com esse palíndromo usando Blast com o objetivo de observar a identidade entre elas.

A Figura 4.4 esquematiza a localização dos genes selecionados no genoma de *M. tuberculosis* cepa H37Rv, assim como as funções conhecidas até o momento. O gene *pkS6* é uma poliketídeo sintase, possivelmente envolvida na síntese de lipídeos; *rpoB* codifica a subunidade B da RNA polimerase e o gene *espA* codifica a proteína A do sistema ESX-1.

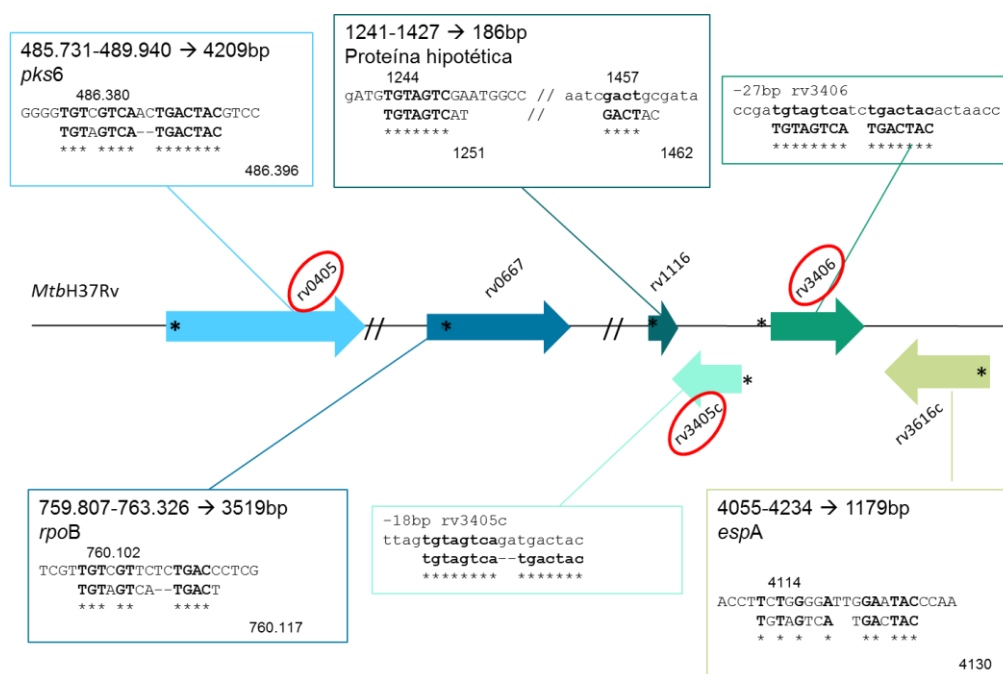


Figura 4.4: Localização no genoma de *M. tuberculosis* e função predita dos genes selecionados para estudo. O alinhamento do motivo palindrômico (sempre na linha de baixo) com as sequências alvos está mostrado nas caixas indicando também a localização no genoma de *M. tb* e função predita. O esquema central representa a posição das sequências alinhadas relativas ao gene alvo (indicada pelo asterisco), podendo estar dentro da região codificante ou em regiões intergênicas. O asterisco indica a localização, nos alvos, da região de similaridade ao motivo palindrômico conservado. O círculo vermelho indica maior identidade entre o motivo palindrômico e as sequências dos alvos.

Para avaliar a possível ação do regulador transcricional Rv3405c sobre esses alvos, oligonucleotídeos foram desenhados e essa ação foi analisada por ensaios de EMSA, RT-PCR e qRT-PCR.

A Figura 4.5 revela a amplificação dos produtos obtidos a partir da técnica de PCR usando oligonucleotídeos específicos. Todos os produtos apresentam o tamanho esperado.

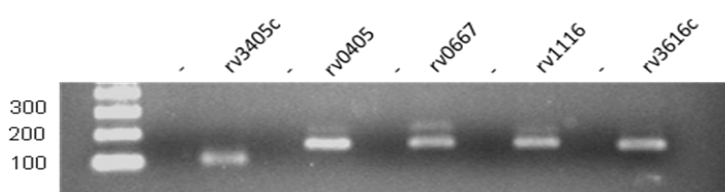


Figura 4.5: Amplificação, através da técnica de PCR, das regiões contendo o possível motivo de ligação de Rv3405c. Eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 0,5x. Foram aplicados 5 μ L de cada amostra amplificada. O resultado confirma os fragmentos nos tamanhos esperados: *rv3405c* – 101 bp; *rv0405* – 156 bp; *rv0667* – 157 bp; *rv1116* – 160 bp e; *rv3616c* – 155 bp. Marcador de tamanho molecular indicado à esquerda (100bp ladder, Invitrogen).

Para verificar se há interação entre a proteína Rv3405c recombinante (disponível no laboratório) com os alvos selecionados, foi realizado ensaio de retardo em gel (EMSA). Neste ensaio utilizamos os fragmentos de PCR biotinilados, representativos dos alvos descritos acima. Retardo na corrida representa uma interação entre a proteína e o DNA analisado.

Como podemos observar na Figura 4.6, o EMSA indica que existe interação entre a proteína Rv3405c e as regiões correspondentes aos genes *rv3405c* e *rv0405*, nas condições do ensaio.



Figura 4.6: EMSA foi realizado usando a região de ligação dos genes *rv0405*, *rv0667*, *rv1116* e *rv3616c* à *Rv3405c*. A proteína recombinante Rv3405c (42µg) foi incubada com 5ng de DNA por 45 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 5% e transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-N e reveladas com o kit LightShift (Pierce). Asteriscos indicam a provável posição do complexo proteína-DNA.

Esse resultado preliminar corrobora com os dados obtidos a partir do alinhamento do motivo palindrômico identificado na região intergênica *rv3405c-rv3406*, onde a maior identidade foi obtida com a sequência do alvo *rv0405* (Figura 4.6).

4.5. Análise quantitativa da expressão gênica

Amostras de RNA obtidas de culturas das cepas recombinantes crescidas em meio axênico foram usadas para análises de expressão gênica. Antes dos ensaios quantitativos, alguns ensaios de controle de qualidade das amostras de RNA foram feitos.

Para avaliar possível contaminação dessas amostras com DNA genômico, mesmo após tratamento com DNase I, foi realizado em paralelo um controle negativo aonde se omitiu a adição de transcriptase reversa (RT-).

Os cDNAs obtidos foram usados em reação de PCR. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 2%, coradas com brometo de etídeo e observadas sob luz ultravioleta (Figura 4.7).

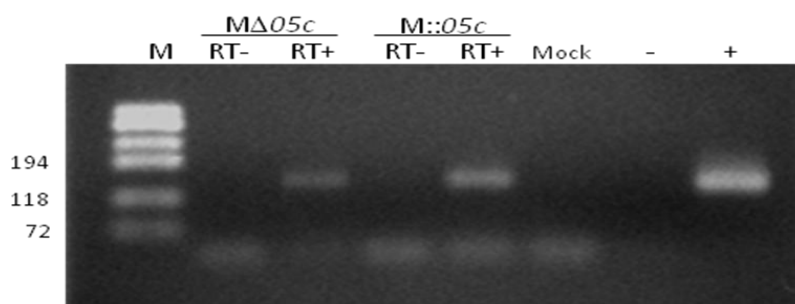


Figura 4.7: Controle de qualidade do cDNA (ausência de DNA genômico contaminante). Amplificação do alvo *sigA* a partir de cDNA obtido de RNA extraído de culturas axênicas das cepas de BCG, conforme indicado na Figura. M – marcador de tamanho molecular, indicado à esquerda em pb. (RT-) Controle de contaminação por DNA genômico; (-) controle negativo do PCR; (+) controle positivo do PCR.

O resultado na Figura acima (Figura 4.7) permitiu concluir que as amostras de cDNA estavam livres de contaminação com DNA genômico. A partir do cDNA obtido das amostras de RNA das cepas recombinantes, fizemos PCR para avaliar a expressão dos alvos selecionados. Com o resultado foi possível observar que não houve diferença na expressão gênica dos alvos entre as cepas recombinantes (Figura 4.8).

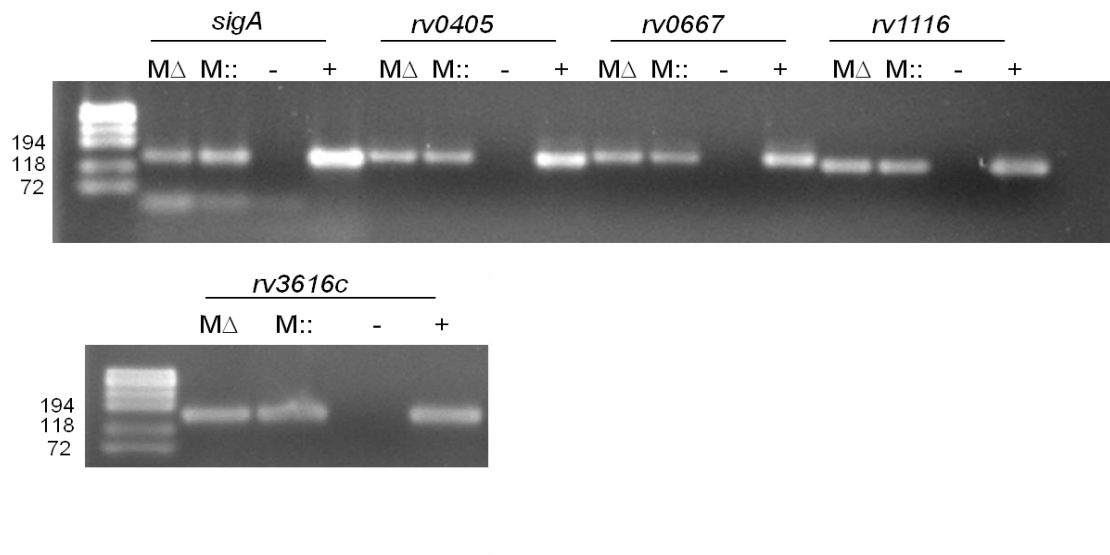


Figura 4.8: Análise da expressão dos genes selecionados para o estudo por RT-PCR. cDNA foram usados para avaliar a expressão gênica. Após a reação de PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose, submetidas à eletroforese, coradas e visualizadas sob luz UV. O padrão de tamanho molecular ($\phi x174$) está indicado à esquerda, em pb. $M\Delta$ = $M\Delta05c$. $M::$ = $M::05c$. - = controle negativo. + = controle positivo.

Para confirmar a expressão do gene funcional nas construções, PCR foi realizado usando oligonucleotídeos para *rv3405c* de BCG Pasteur. Na Figura 4.9 é possível confirmar que a cepa recombinante $M\Delta05c$ (portadora do vetor vazio) não foi capaz de expressar o gene *rv3405c* funcional, presente na cepa recombinante $M::05c$. Com relação ao gene *rv3406*, controlado pelo repressor transcricional Rv3405c, podemos confirmar sua expressão pela cepa $M\Delta05c$ (incapaz de expressar Rv3405c funcional) e sua baixa expressão pela cepa $M::05c$ (que produz o repressor transcricional ativo), confirmando que a presença da proteína Rv3405c reprime a expressão do gene *rv3406*.

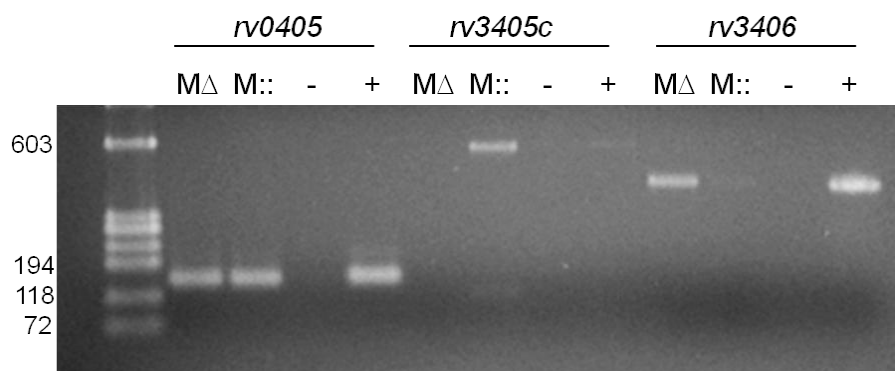


Figura 4.9: Amplificação dos alvos *rv0405*, *rv3405c* e *rv3406* por PCR a partir de amostras de cDNA. cDNA foram usados para avaliar a expressão gênica. Após a reação de PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose, submetidas a eletroforese, coradas e visualizadas sob luz UV. O padrão de tamanho molecular (ϕ x174) está indicado à esquerda, em pb. MΔ = MΔ05c. M:: = M::05c. - = controle negativo. + = controle positivo.

Para avaliar possíveis alterações quantitativas na expressão dos genes selecionados, ensaios de RT-qPCR foram realizados a partir de amostras de RNA extraído de culturas axênicas das cepas BCG (MΔ05c e M::05c).

Utilizamos o gene *sigA* como normalizador e, apesar de testarmos diferentes concentrações dos iniciadores (20 nM a 100 nM) e diferentes temperaturas de anelamento/extensão (58 °C e 60 °C) não conseguimos uma condição livre da formação de dímeros (Figura 4.10). Essa condição não permitiu uma quantificação precisa dos outros genes selecionados.

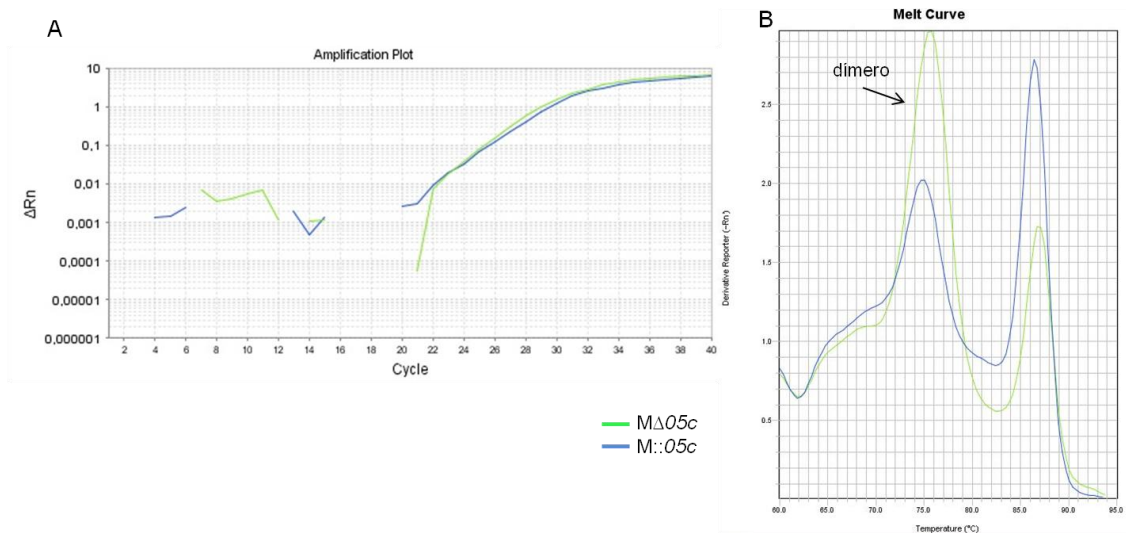


Figura 4.10: Curvas de amplificação (A) e desnaturação (B) para o gene *sigA*. RT-qPCR realizado a partir de cDNA obtido de RNA de culturas axênicas das cepas recombinantes de BCG Moreau (*MΔ05c* e *M::05c*). Foram usados 100 nM de cada iniciador específico e 25 ng de cDNA por reação.

Na Figura 4.10 podemos observar que *sigA* foi expresso de forma constitutiva pelas cepas recombinantes (*MΔ05c* e *M::05c*), confirmando sua aplicabilidade como gene normalizador para a análise da expressão dos genes de interesse. Entretanto, é possível observar na Figura 4.12B a presença de muitos dímeros dos iniciadores que impediram que a quantificação dos demais genes fosse realizada com precisão. Ainda são necessários outros experimentos de padronização do alvo *sigA*, visando obter uma condição experimental onde não ocorra essa formação de dímeros.

Apesar das dificuldades encontradas, não foram observadas diferenças quantitativas em relação à expressão dos genes *rv0405*, *rv0667*, *rv1116* e *rv3616c* entre as cepas recombinantes, como revela a Figura 4.11.

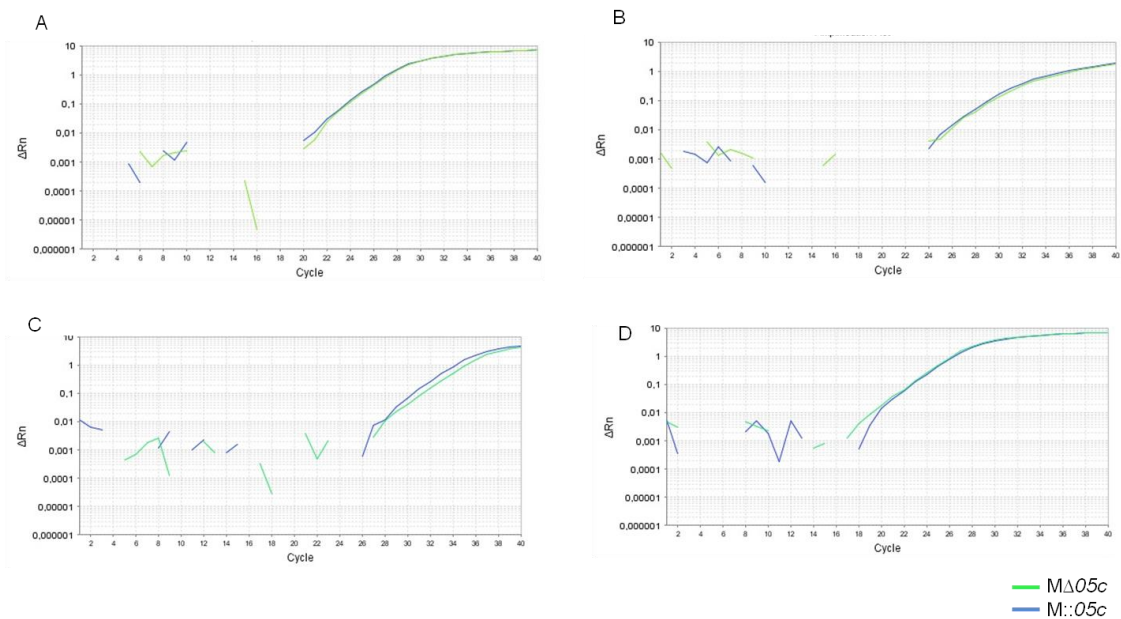


Figura 4.11: Curvas de amplificação para os genes *rv0405* (A), *rv0667* (B), *rv1116* (C), e *rv3616c* (D). RT-qPCR realizado a partir de cDNA obtido de RNA de culturas axênicas das cepas recombinantes de BCG Moreau (M Δ 05c e M::05c). Foram usados 200 nM de cada iniciador e 25 ng de cDNA por reação.

Para o gene *rv3405c*, o resultado sugere sua expressão apenas na cepa M::05c, o que reforça o resultado esperado uma vez que essa cepa foi complementada com o gene *rv3405c* de BCG Pasteur (Figura 4.12A). Apesar de visualizarmos uma curva de amplificação referente à cepa M Δ 05c, a análise da curva de desnaturação indica que isso reflete apenas a presença de dímeros e não de uma amplificação específica.

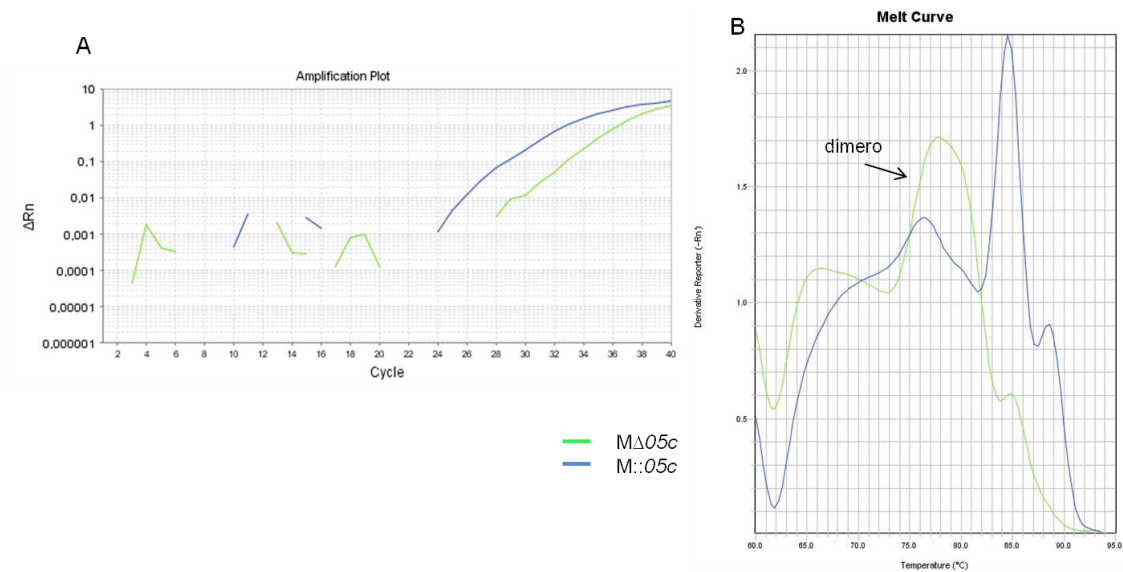


Figura 4.12: Curvas de amplificação (A) e desnaturação (B) do gene *rv3405c*. RT-qPCR realizado partir de cDNA obtido de culturas axênicas das cepas de BCG Moreau (M Δ 05c e M::05c). Foram usados 200 nM de cada iniciador específico e 25 ng de cDNA por reação.

A análise da expressão do gene *rv3406* confirma dados anteriores do laboratório (Galvão *et al.*, 2014) - a presença do repressor transcricional Rv3405c funcional na cepa complementada M::05c inibe a expressão do gene *rv3406* (Figura 4.13). Assim, uma quantificação preliminar permite sugerir que *rv3406* é aproximadamente 128 vezes mais expresso em M Δ 05c do que em M::05c, porque a amostra M Δ 05c apresentou uma amplificação com um valor de Ct 7 unidades maior que o Ct da amostra M::05c.

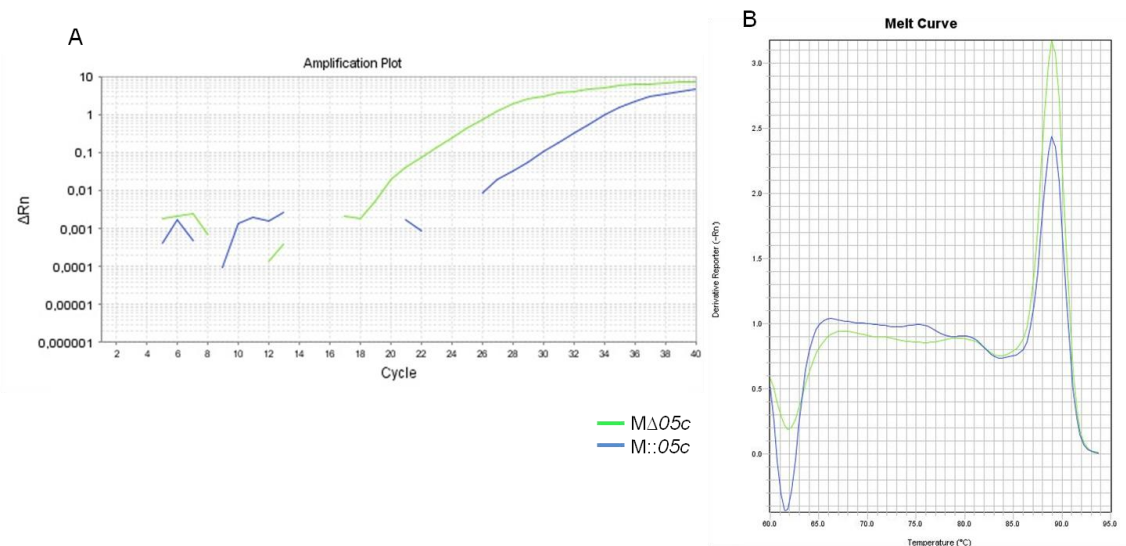


Figura 4.13: Curvas de amplificação (A) e desnaturação (B) para o gene *rv3406*. RT-qPCR realizado partir de cDNA obtido de culturas axênicas das cepas recombinantes de BCG Moreau (*MΔ05c* e *M::05c*). Foram usados 200 nM de cada iniciador específico e 25 ng de cDNA por reação.

4.6. Viabilidade intracelular dos BCGs recombinantes

Para compreender a influência da presença do repressor transcricional *rv3405c* na viabilidade dos BCGs recombinantes no ambiente intracelular, realizamos experimentos de infecção. Foram utilizadas células da linhagem monocítica humana THP-1 diferenciadas em macrófagos (mdTHP-1) com adição de 200 nM de PMA por 48 horas e recuperação por mais 48 horas antes da infecção (na ausência de PMA).

mdTHP-1 foram infectados usando multiplicidade de infecção (MOI) 1:1 (bactéria:célula) dos BCGs recombinantes, *MΔ05c* e *M::05c*. A viabilidade bacteriana foi acompanhada em tempos específicos pós-infecção (4h, 6h, 24h, 48h, 72h e 96h) a partir da lise das células, recuperação das bactérias por centrifugação e plaqueamento de diluições em meio sólido 7H10 acrescido de

ADC e canamicina por cerca de 28 dias. Após esse período, foi contado o número de unidades formadoras de colônias (UFC).

Observamos que não houve diferença na taxa de internalização entre as cepas usando MOI de 1:1 (Figura 4.14). A taxa de internalização foi calculada com base na CFU usada na infecção e na CFU obtida no tempo de 4 horas após a infecção.

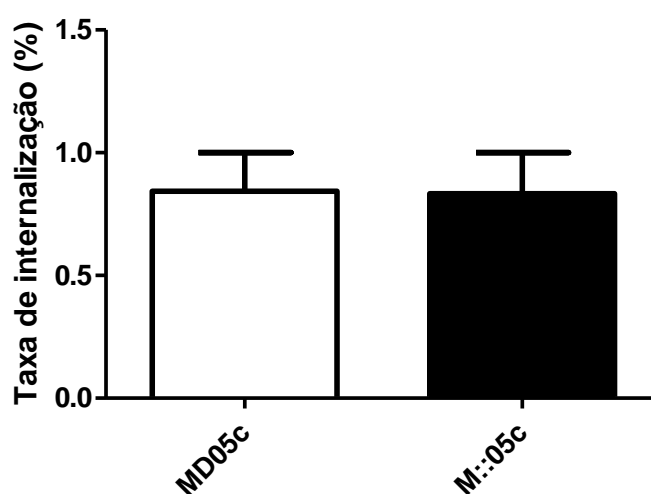


Figura 4.14: Taxa de internalização das cepas recombinantes MΔ05c e M::05c (MOI 1:1). A taxa de internalização é calculada considerando a CFU usada na infecção dividida pela CFU recuperada no tempo de 4 horas pós-infecção. Para infecção usando MOI de 1:1 não observamos diferença na taxa de internalização entre as cepas recombinantes. Análise estatística: Teste-t não pareado. +/- Desvio Padrão (DP).

A Figura 4.15 mostra a cinética de viabilidade intracelular dos BCGs em tempos específicos após a infecção de mdTHP-1 com as cepas MΔ05c e M::05c, usando multiplicidade de infecção de 1:1.

Os dados revelam que $M\Delta05c$ apresentou maior viabilidade em ambiente intracelular do que $M::05c$ e não foram observadas diferenças significativas entre as cepas recombinantes, nos tempos analisados. Estes dados indicam que a presença do repressor transcricional Rv3405c funcional impacta a sobrevivência intracelular de BCG Moreau.

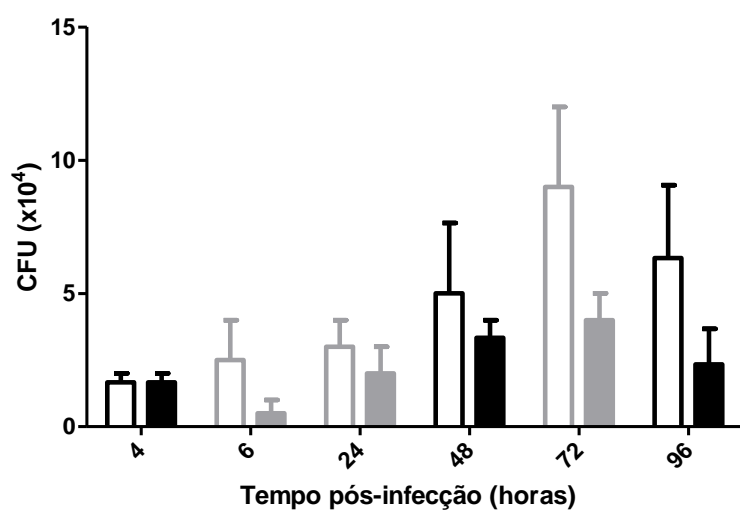


Figura 4.15: Cinética de viabilidade intracelular dos BCGs recombinantes pós-infecção (MOI = 1:1). Macrófagos foram infectados com as cepas recombinantes durante 4h e a viabilidade dos BCGs avaliada em tempos específicos após infecção. Barras brancas representam a cepa $M\Delta05c$ e as barras pretas, a cepa $M::05c$. Esses resultados representam a média de 3 experimentos. Barras em cinza claro representam a média de 2 experimentos. Análise estatística: Teste-t não pareado.

4.7. Análise da morfologia das colônias após infecção de células

THP-1

A partir das placas utilizadas para análise de CFU (item 4.6), a morfologia das colônias foi observada. A Figura 4.16 revela a morfologia das colônias obtidas a partir da infecção de mdTHP-1 infectadas com $M\Delta 05c$ e $M::05c$, respectivamente, nos tempos específicos pós-infecção. As imagens obtidas revelam que ambas as construções de BCGs recombinantes possuem uma única morfologia de colônia. As colônias apresentam aspecto rugoso com pouco espreadimento e projeções no sentido vertical.

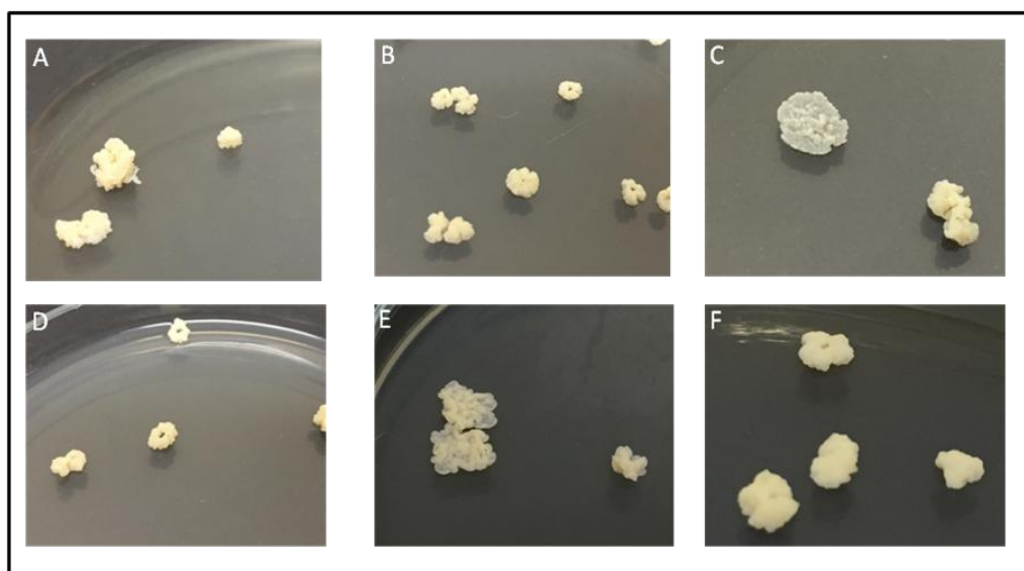


Figura 4.16: Perfil representativo de colônias das cepas recombinante de $M\Delta 05c$ e $M::05c$. Após lise dos macrófagos infectados, bactérias foram recuperadas em tempos específicos após a infecção e plaqueadas em 7H10 acrescido de ADC e canamicina. As Figuras A-C mostram o perfil morfológico das colônias de $M\Delta 05c$ nos tempos de 4h, 48h e 96h, respectivamente, enquanto que as Figuras D-F representam o perfil das colônias de $M::05c$ nos mesmos tempos.

Ao observar a morfologia das colônias recuperadas após a infecção com $M\Delta 05c$, no tempo de 96 horas, colônias lisas e com espreadimento foram observadas (Figura 4.16C). Esse tipo de colônia não foi observado em outros

tempos e colônias desse tipo não foram numericamente expressivas. Esse tipo de colônia já foi descrito para cepas de BCG Tokyo (Bedwell *et al.*, 2011).

4.8. Perfil de viabilidade dos macrófagos em resposta à infecção

Com o objetivo de observar a viabilidade dos macrófagos ao longo do estudo, usamos o método PrestoBlue™ (ThermoFisher®) que consiste na conversão do composto Resazurina por células metabolicamente ativas. Assim, em intervalos de 24 horas por um período total de 96h, a viabilidade dos macrófagos não-infectados e infectados com os BCGs recombinantes (usando MOI de 10:1 e 1:1) foi avaliada.

Os resultados apresentados na Figura 4.17 mostram que não houve perda significativa da viabilidade celular entre os macrófagos infectados com as cepas de BCG usando MOI de 1:1 ou de 10:1. Também não observamos diferenças na viabilidade ao comparar o percentual de células viáveis infectadas pelas cepas recombinantes.

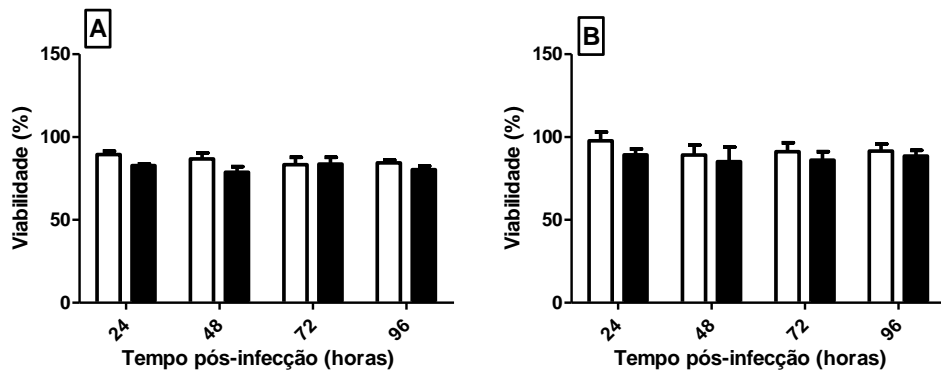


Figura 4.17: Viabilidade de macrófagos infectados com as cepas recombinantes M Δ 05c e M::05c usando MOI de 1:1 (A) e 10:1 (B). A viabilidade celular dos macrófagos foi avaliada usando PrestoBlue™ nos tempos de 24, 48, 72 e 96h pós-infecção. Os dados expressam a viabilidade de macrófagos infectados relativos ao controle de macrófagos não-infectados. Barras brancas = M Δ 05c; barras pretas = M::05c. Os resultados expressam a média (+/- DP) de 4 experimentos independentes. Análise estatística: Teste-t não pareado.

4.9. Perfil de secreção de citocinas em resposta à infecção

Considerando que os macrófagos são células alvo para a infecção por micobactérias e com o objetivo de compreender como essas células responderam à infecção com as 2 diferentes cepas recombinantes de BCG e aos diferentes MOI (10:1 e 1:1), os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , da citocina anti-inflamatória IL-10 e da quimiocina MIP-1 β foram analisados através das técnicas de citometria de fluxo e de ELISA. Inicialmente, realizamos uma triagem das citocinas por citometria de fluxo e após, os resultados foram confirmados pela técnica de ELISA.

Não foram observadas diferenças significativas com relação à secreção das citocinas quando testadas por citometria de fluxo (Figura 4.18).

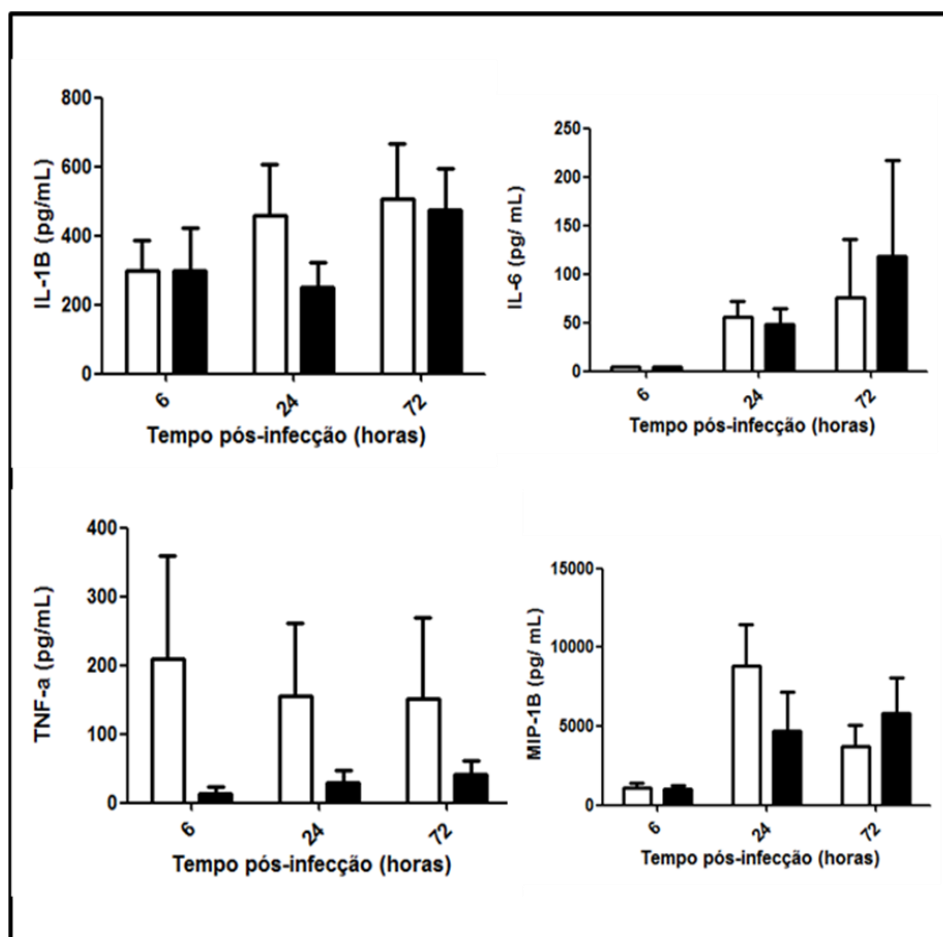


Figura 4.18: Cinética de produção das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e MIP-1 β por macrófagos infectados com os cepas recombinantes na MOI 10:1 (citometria de fluxo). A partir do sobrenadante das culturas dos macrófagos infectados com as cepas M Δ 05c (barras brancas) e M::05c (barras pretas), avaliamos o perfil de secreção citocinas nos tempos de 6, 24 e 72 horas pós-infecção. Os resultados expressam a média (+/- DP) de 3 experimentos independentes. Análise estatística: teste-t não pareado.

A Figura 4.19 mostra os resultados obtidos por ELISA relativos à secreção de IL-1 β por mdTHP1 infectados com as cepas recombinantes nas MOI de 1:1 e 10:1. Não foram observadas diferenças significativas entre as cepas nos tempos estudados na MOI de 10:1; no entanto, usando MOI de 1:1 no tempo de 72 horas, os níveis de IL-1 β foram significativamente maiores (* $p < 0,05$) em macrófagos infectados com a cepa selvagem ($M\Delta 05c$) do que com a cepa complementada ($M::05c$).

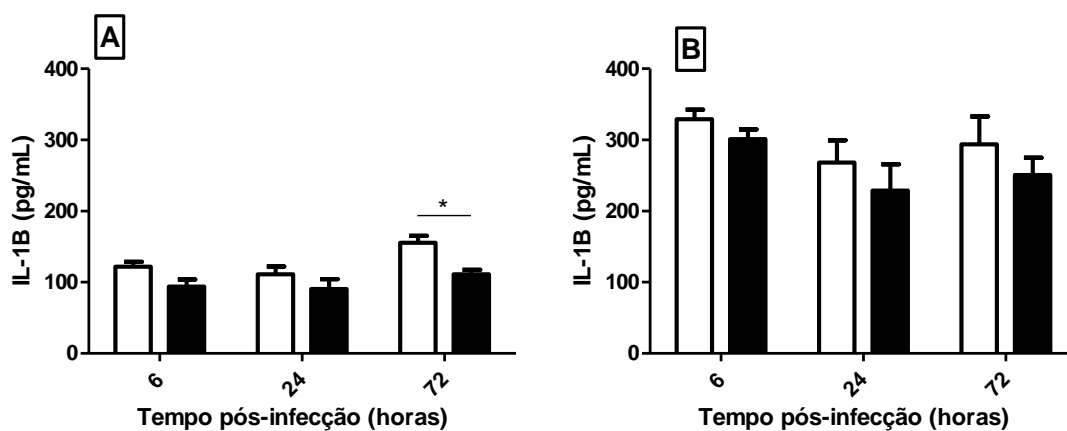


Figura 4.19: Cinética de produção da citocina IL-1 β usando MOI de 1:1 (A) e 10:1 (B) utilizando a técnica de ELISA. A partir do sobrenadante das culturas dos macrófagos infectados com as cepas $M\Delta 05c$ (barras brancas) e $M::05c$ (barras pretas), avaliamos o perfil de secreção de IL-1 β nos tempos de 6, 24 e 72 horas. Os resultados expressam a média de 3 experimentos independentes (+/- DP). Análise estatística: teste-t não pareado. * $p < 0,05$.

Com relação à IL-6, os resultados obtidos por ELISA mostram que houve aumento significativo na secreção da citocina no tempo de 72h tanto para MOI de 1:1 (**p<0,001) quanto para MOI de 10:1 (*p<0,05). Interessante ressaltar que essa foi a única citocina com expressão maior na cepa M::05c do que na cepa MΔ05c (Figura 4.20).

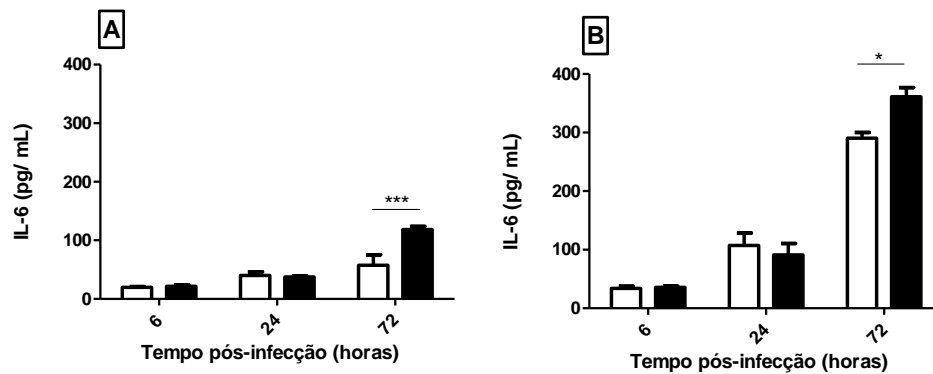


Figura 4.20: Cinética de produção da citocina IL-6 usando MOI de 1:1 (A) e 10:1 (B) utilizando a técnica de ELISA. A partir do sobrenadante das culturas dos macrófagos infectados com as cepas MΔ05c (barras brancas) e M::05c (barras pretas), avaliamos o perfil de secreção de IL-1β nos tempos de 6, 24 e 72 horas. Os resultados expressam a média de 3 experimentos independentes (+/- DP). Análise estatística: teste-t não pareado. *p<0,05, ***p<0,001.

A análise da secreção de TNF- α utilizando a técnica de ELISA só apresentou diferença significativa (** $p < 0,001$) no tempo de 6 horas em relação às cepas recombinantes estudadas na MOI de 10:1. Essa diferença também foi observada no ensaio por citometria de fluxo; entretanto, devido ao alto desvio padrão, não foi significativa. Nos outros tempos avaliados não foram observadas diferenças (Figuras 4.21A e 4.21B).

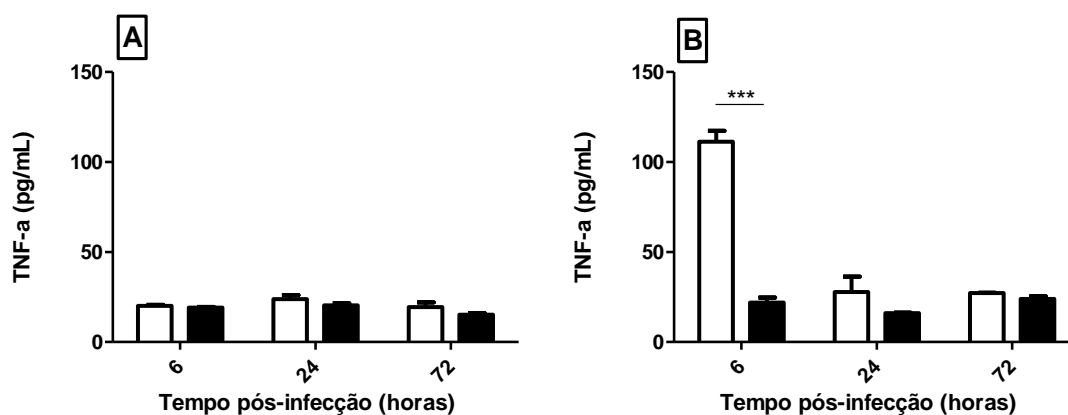


Figura 4.21: Cinética de produção da citocina TNF- α usando MOI de 1:1 (A) e 10:1 (B) utilizando a técnica de ELISA. A partir do sobrenadante das culturas dos macrófagos infectados com as cepas M Δ 05c (barras brancas) e M::05c (barras pretas), avaliamos o perfil de secreção de IL-1 β nos tempos de 6, 24 e 72 horas. Os resultados expressam a média de 3 experimentos independentes (+/- DP). Análise estatística: teste-t não pareado. *** $p < 0,001$.

Nós também analisamos a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figuras 4.22A e 4.22B) e da quimiocina MIP-1 β (Figuras 4.23A e 4.23B). Para ambas, não observamos diferenças significativas ao longo dos tempos de infecção e MOI analisados. A avaliação da secreção de IL-10 só foi realizada pela técnica de ELISA.

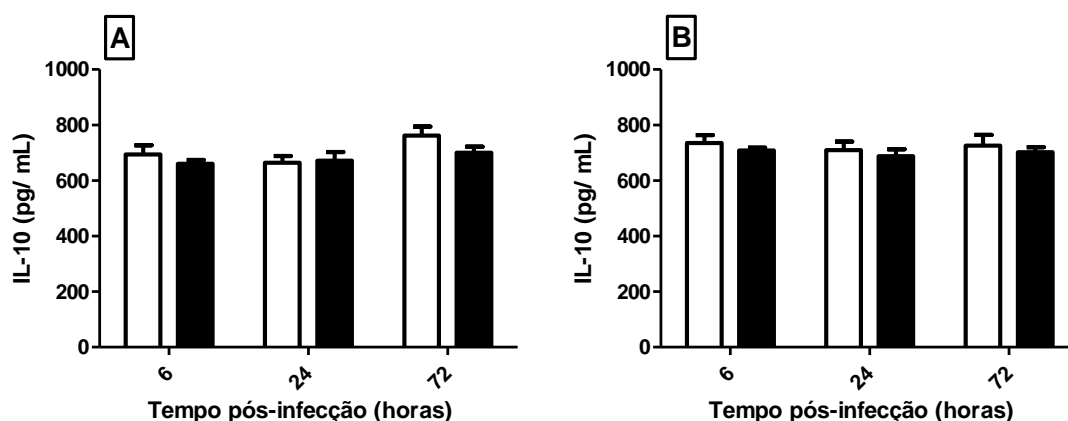


Figura 4.22: Cinética de produção da citocina IL-10 usando MOI de 1:1 (A) e 10:1 (B) utilizando a técnica de ELISA. A partir do sobrenadante das culturas dos macrófagos infectados com as cepas M Δ 05c (barras brancas) e M::05c (barras pretas), avaliamos o perfil de secreção de IL-1 β nos tempos de 6, 24 e 72 horas. Os resultados expressam a média de 3 experimentos independentes (+/- DP). Análise estatística: teste-t não pareado.

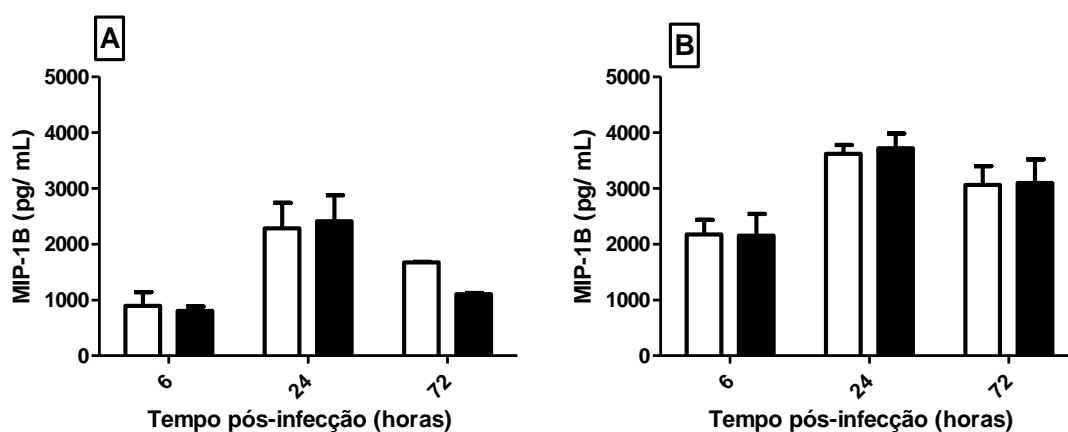


Figura 4.23: Cinética de produção da quimiocina MIP-1 β usando MOI de 1:1 (A) e 10:1 (B) utilizando a técnica de ELISA. A partir do sobrenadante das culturas dos macrófagos infectados com as cepas M Δ 05c (barras brancas) e M::05c (barras pretas), avaliamos o perfil de secreção de IL-1 β nos tempos de 6, 24 e 72 horas. Os resultados expressam a média de 3 experimentos independentes (+/- DP). Análise estatística: teste-t não pareado.

4.10. Avaliação da expressão da proteína Rv3406

Com o objetivo de observar se as condições no ambiente intracelular testadas seriam capazes de induzir a expressão do gene *rv3406*, regulado negativamente pelo repressor transcricional Rv3405c e, com isso, permitir a produção de Rv3406, utilizamos a técnica de western blot para detectar a presença da proteína. Macrófagos infectados com as cepas BCG foram lisados (96 horas após infecção), centrifugados e o sedimento bacteriano resultante utilizado para extração de proteínas totais. As proteínas obtidas foram fracionadas em gel SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose (Figura 4.24A). A expressão da proteína Rv3406 foi visualizada por *western blot* utilizando anticorpo policlonal de camundongo anti-Rv3406 recombinante (disponível no laboratório; Galvão *et al.*, 2014). O resultado mostrado na Figura 4.24B confirma a expressão de Rv3406 nas amostras oriundas de macrófagos infectados com a cepa M Δ 05c, mas não pela cepa complementada com *rv3405c*, confirmando sua ação como repressor transcricional de *rv3406*.

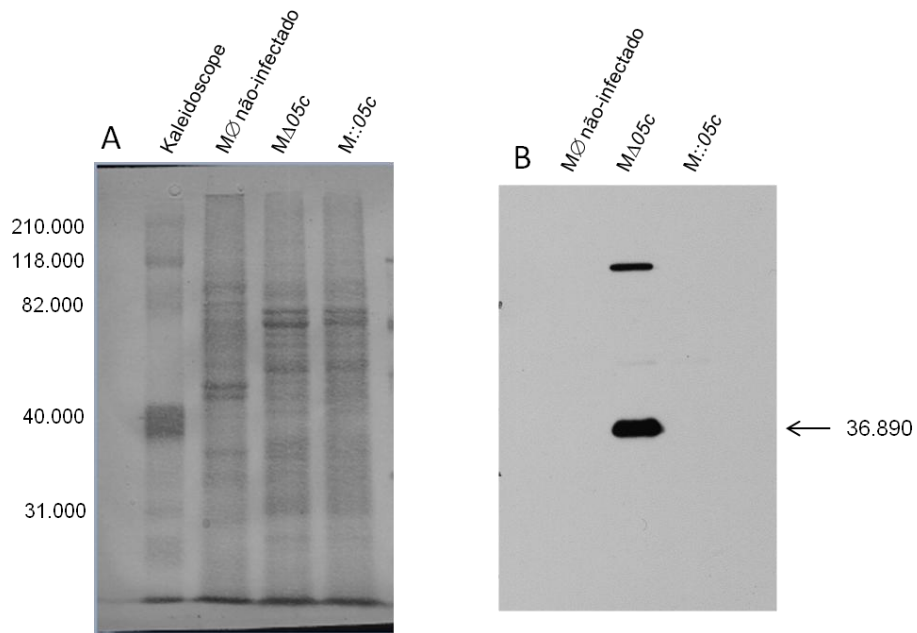


Figura 4.24: Expressão da proteína Rv3406. Macrófagos infectados com as cepas de BCG, e após 96 horas foram lisados e as proteínas de BCG quantificadas e aplicadas em gel de poliácridamida. Após, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e coradas com MemCode (A). *Western-blot* foi feito usando anticorpo policlonal anti-Rv3406 (B).

5. Discussão

No presente estudo, objetivando avaliar o impacto da presença do repressor transcricional *rv3405c* na vida intracelular do BCG Moreau, utilizamos 2 cepas de BCG recombinantes cuja única diferença é a complementação com o gene *rv3405c* de BCG Pasteur, em uma das construções (M::05c). Para entender esse impacto, utilizamos o modelo de infecção de macrófagos diferenciados a partir de células THP-1 e analisamos a viabilidade das bactérias e das células, bem como o perfil de secreção de citocinas em resposta à infecção. Ainda no intuito de entender o impacto de *rv3405c* na vida do bacilo, buscamos avaliar que outros possíveis genes poderiam estar sob controle desse repressor através de ensaios que avaliam a ligação da proteína Rv3405c aos genes alvos selecionados e também através de ensaios qualitativos e quantitativos que avaliam a transcrição gênica.

Estudos do nosso grupo, ao analisar dados proteômicos comparando as proteínas de superfície das cepas BCG Moreau e BCG Pasteur, revelaram diferença qualitativa na expressão de uma única proteína (Pagani *et al.*, manuscrito em preparação). Essa proteína foi identificada como Rv3406, codificada pelo gene *rv3406* localizado ao lado do gene codificante para o regulador transcricional *rv3405c*. *rv3405c* está truncado em BCG Moreau devido à perda da região genômica RD16 (*rv3400-rv3405c*). Outro trabalho do grupo comprovou que Rv3405c regula negativamente a expressão de *rv3406* (Galvão *et al.*, 2014).

Nossos resultados indicam que a ausência do repressor transcricional *rv3405c* (na cepa $M\Delta 05c$) favorece o crescimento tanto em meio axênico (Figura 4.3) como em ambiente intracelular (Figuras 4.15) quando comparado ao crescimento da cepa recombinante complementada com o gene *rv3405c* funcional de BCG Pasteur ($M::05c$).

Nossos resultados de análise de crescimento bacteriano sugerem que a presença da Rv3406 nas cepas $M\Delta 05c$ poderia ser um fator contribuinte para a melhor adaptação da bactéria quando comparado à cepa $M::05c$ (Figura 4.15), podendo conferir um ganho funcional relacionado ao metabolismo de enxofre e aquisição de carbono nos meios axênico e intracelular.

Existem poucos trabalhos na literatura sobre a Rv3406, que foi caracterizada como uma alquil sulfatase. Sulfatases são responsáveis pela quebra de ésteres de sulfato e estão envolvidas em diversos processos metabólicos. A família das sulfatases hidrolisam ésteres de sulfato encontrados na superfície dos patógenos e é importante na interação parasito-hospedeiro (Hossain *et al.*, 2009). O genoma de *M. tb* contém 9 sulfatases, mas apenas uma sulfatase do tipo II, a Rv3406, que é a mais conservada em espécies de micobactérias, sugerindo sua importância no metabolismo de sulfatos; se considerarmos a variedade de substratos disponíveis no hospedeiro humano, especular sobre a natureza precisa dos substratos fisiológicos de Rv3406 é bastante difícil (Sogi *et al.*, 2013).

De acordo com Calmette *et al.* (1931) a presença de glicerol, usado no meio de cultura durante o processo de atenuação, poderia acelerar o processo de crescimento do BCG. Nesse contexto, seria possível sugerir que a perda da

RD16, acarretando na expressão constitutiva de Rv3406, poderia conferir uma vantagem seletiva (ganho funcional) durante as passagens *in vitro* em meio contendo bile glicerinada.

De acordo com Mougous *et al.* (2002) nenhuma bactéria com genoma conhecido possui tantas sulfotransferases e sulfatases como as micobactérias. Estudos sobre essas duas famílias poderiam fornecer subsídios para compreender as vias de metabolismo dos sulfatos e ainda aumentar a compreensão sobre moléculas sulfatadas na biologia e patologia das micobactérias.

Além disso, sulfatases micobacterianas poderiam estar envolvidas na aquisição de enxofre na forma de sulfatos a partir do ambiente ou da célula hospedeira. Assim, essas enzimas poderiam fornecer fontes alternativas de enxofre para a produção de aminoácidos essenciais e cofatores contendo enxofre (Mougous *et al.*, 2002).

Sulfonatos e ésteres de sulfato são abundantes na natureza e muitos microrganismos podem usar uma gama de sulfatases com diferentes especificidades para usá-los como fonte de carbono e/ou de enxofre (Kertesz, 2000).

Segundo Schwab *et al.* (2009), interações entre *M. tb* e macrófagos pulmonares são fundamentais na instalação da tuberculose. Um dos fatores que pode ser importante nessas interações e no comportamento das micobactérias é a presença dos surfactantes pulmonares. De acordo com Dodd *et al.* (2016) surfactante é uma monocamada predominantemente composta de

lipídeos baseados em fosfocolina, com pequenas quantidades de outros fosfolipídeos e colesterol.

Na ausência de infecção, os macrófagos alveolares contribuem para o catabolismo dos surfactantes para manter a homeostase pulmonar. Acredita-se que essa função crie células hospedeiras susceptíveis à infecção por *M. tb* devido às propriedades imunossupressoras dos surfactantes e à presença de metabólitos lipídicos disponíveis como fonte de carbono (Dodd *et al.*, 2016).

De acordo com Dodd e colaboradores (2016), CD36 é um receptor *scavenger*, que interage com receptores do tipo *Toll* para mediar a localização e sinalização celular durante infecção e inflamação. CD36 funciona como um receptor de surfactante lipídicos e tem sua expressão e localização mediada pela presença de surfactantes lipídicos e proteínas. CD36 contribui para a captura de surfactantes lipídicos por macrófagos humanos, conferindo uma vantagem ao crescimento bacteriano durante os estágios iniciais da infecção por *M. tb* pelo menos em parte pela redução de TNF- α .

Garton *et al.* (2008) analisaram o perfil transcricional de pacientes com TB e detectaram a presença de RNA mensageiro de *rv3406* no escarro desses pacientes. A transcrição desse gene foi significativamente maior em escarro do que em crescimento aeróbico.

A mucina presente em pacientes com infecções pulmonares decorrentes de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* é altamente sulfatada, aumentando a resistência à degradação bacteriana. A dessulfatação aumenta a susceptibilidade de degradação da mucina por glicosidases e proteases

bacterianas, assim facilitando a colonização bacteriana pelo aumento da disponibilidade de substratos e sítios de ligação (Jansen *et al.*, 1999).

Bactérias do solo, como *Pseudomonas putida*, codificam uma grande variedade de sulfatases que são positivamente reguladas sob condições de privação de sulfatos, sugerindo uma função na retirada de sulfatos. Sogi *et al.* (2013) sugeriram, a partir de análises de bioinformática, que a alquil sulfatase de *M. tb*, Rv3406, está mais próxima da já caracterizada alquil sulfatase de *P. putida* cepa S313. Isso pode sugerir que possuam funções similares da dessulfatação, favorecendo a colonização pela bactéria.

Brennan (2003) afirma que cepas virulentas possuem grandes concentrações de lipídeos acidificados (notavelmente sulfolipídeos), enquanto que as cepas atenuadas são deficientes nesses compostos. Tem sido proposto que glicolipídeos sulfatados possam estar envolvidos na sobrevivência intracelular de *M. tb* pela interação com fagossomo e prevenção da fusão com o lisossomo (revisto por Rivero-Marrero *et al.*, 2002).

Minch e colaboradores (2014) utilizaram mais de 150 proteínas recombinantes, representativas de cerca de 80% dos fatores transcricionais (FT) preditos no genoma de *M. tb* e caracterizaram através de ChiP-Seq mais de 5.400 interações proteína-DNA com grande probabilidade de controle transcricional direto de alvos proximais. Um dos FT utilizados foi a proteína Rv3405c, com 6 interações relatadas quando considerada a janela de -150 a +70 pb relativos ao início do gene – *rv3405c*, *rv3406*, *rv0405*, *rv0667*, *rv1116* e *rv3616c*. Assim, estes alvos foram escolhidos para uma análise mais detalhada no nosso estudo. Evidentemente, outras abordagens como busca *in silico* no

genoma de *M. tb* e BCG Moreau pelo motivo palindrômico identificado na região intergênica *rv3405c-rv3406*, ou a análise global de expressão gênica por RNAseq, poderiam fornecer alvos adicionais aos selecionados nesse estudo.

Uma dificuldade encontrada nos experimentos de expressão gênica se refere ao gene normalizador *sigA* que, devido à presença de dímeros, impediu a quantificação correta dos genes alvo (Figura 4.10). Pode ser necessário buscar outros genes constitutivamente expressos pelas diferentes cepas que possam ser usados como normalizadores antes da realização de novos experimentos. Apesar dessa dificuldade, nossos resultados preliminares mostram que não houve diferença na expressão gênica dos alvos selecionados (*rv0405*, *rv0667*, *rv1116* e *rv3616c*) (Figura 4.11) e confirmaram que a expressão gênica de *rv3406* é cerca de 130 vezes maior em $M\Delta05c$ comparada à cepa complementada (Figura 4.13).

Utilizamos ensaio de mobilidade (EMSA) para avaliar a interação entre a proteína recombinante Rv3405c e os alvos selecionados. Nossos resultados revelaram que houve formação de complexo DNA-proteína com a região de *rv0405* descrita por Minch e colaboradores (2014) (Figura 4.6). Esse resultado reforça o dado que mostra a elevada identidade entre o palíndromo conservado da região intergênica *rv3405c-rv3406* com a sequência alvo do gene *rv0405* (Figura 4.4). Para os outros alvos estudados, não vimos, nas condições testadas, interação com a proteína recombinante Rv3405c.

rv0405 (*pks6*) já havia sido identificado como um gene de virulência em *M. tb* (Camacho *et al.*, 1999) e um dos 16 genes no genoma de *M. tb* descrito

como codificante para policetídeos sintases (Cole *et al.*, 1998). As policetídeos sintases são uma família de enzimas conhecidas pelo envolvimento na biossíntese de policetídeos naturais. A capacidade de biossíntese de policetídeos por *M. tb* tem sido investigada uma vez que ortólogos desse gene também foram encontrados em outras espécies de micobactérias. É sabido que a maioria dos genes que codifica para as Pks de *M. tb* está ligada às vias biossintéticas específicas ou conjugados glicolipídeos que são importantes para virulência e/ou componentes da parede celular das micobactérias (Quadri, 2014). Entretanto, a análise comparativa dos genomas de *M. tb*, *M. bovis* e BCG (Pasteur e Moreau) mostra que o gene *rv0405* sofreu a inserção de uma base que ocasionou a mudança de fase e o aparecimento de um códon de parada prematuro. Assim, tanto *M. bovis* quanto BCG são provavelmente incapazes de produzir uma Pks6 funcional.

Nosso estudo tem limitações devido ao fato de ter sido realizado com células de linhagem; no entanto, o uso de células THP-1 tem vantagens como a facilidade de expansão e diferenciação em macrófagos. Nossos dados fornecem subsídios para compreender o comportamento da bactéria em resposta ao ambiente intracelular e o comportamento da célula hospedeira em resposta à infecção bacteriana. Esse estudo indica que esse modelo de infecção *in vitro* pode ser usado para avaliar as viabilidades celular e bacteriana e secreção de citocinas.

Daigneault e colaboradores (2010) compararam a diferenciação de células THP-1 em resposta aos estímulos com vitamina D3 e PMA e comparou com monócitos e macrófagos humanos parâmetros como morfologia, adesão

celular, expressão de marcadores de superfície e capacidade fagocítica. Os resultados mostraram que as células estimuladas com 200 nM de PMA por 72 horas e sem tempo de recuperação apresentaram fenótipo mais próximo dos macrófagos derivados de monócitos humanos.

O protocolo para diferenciação dos macrófagos a partir de monócitos de linhagem THP-1 usando PMA é bastante diverso na literatura, com uso de concentrações variando entre 30 nM (Sousa-Vasconcelos *et al.*, 2015), 80 nM (Guerreiro *et al.*, 2013), 100 nM (Mendoza-Coronel & Castañón-Arreola, 2016) e 200 nM (Daigneault *et al.*, 2010). Além da concentração de PMA, o tempo de exposição e de repouso pós-diferenciação também são bastante diversos. A falta de um protocolo uniforme impacta fortemente na interpretação dos resultados e na comparação entre os estudos. No nosso laboratório foram testados vários protocolos de diferenciação das células THP-1 usando diferentes concentrações de PMA (30 nM, 80 nM e 200 nM) com e sem tempo de descanso sem a droga após o estímulo. Ao final desses experimentos que analisaram parâmetros como morfologia e viabilidade celulares, optamos por estimular as células com 200 nM de PMA por 48 horas e as células diferenciadas foram mantidas em meio sem PMA pelo mesmo tempo para assegurar que as células se recuperem do estímulo antes da infecção (Daigneault *et al.*, 2010 – adaptado).

Chavez-Galán *et al.* (2016) revelam que a infecção com cepas avirulentas de micobactérias é capaz de induzir altos níveis de apoptose em monócitos e macrófagos humanos e linhagens celulares de macrófagos. Ao contrário, outros autores descrevem que a apoptose é induzida exclusivamente

por cepas virulentas de *M. tb* em processo que envolve a participação da proteína ESAT-6 (revisto por Aguilo *et al.*, 2013). Nosso estudo revelou que a infecção com as cepas recombinantes resultou em pouca perda da viabilidade celular. Esse dado corrobora os de Molina-Torres e colaboradores (2010) que constataram que a toxicidade de BCG Pasteur em células THP-1 não é detectada até o sétimo dia.

A viabilidade dos macrófagos foi determinada pelo método de fluorescência usando o reagente comercial PrestoBlue™ nos tempos de 24 a 96 horas. Nas condições experimentais utilizadas no nosso estudo, as cepas recombinantes não induziram perda significativa da viabilidade dos macrófagos seja na MOI de 1:1 ou MOI de 10:1, que variou entre 78 a 89% e 85 a 97%, respectivamente, ao longo do tempo analisado (Figura 4.17). Apesar dos dados disponíveis sobre ativação e morte de macrófagos por *M. tb*, pouco ainda se sabe sobre as atividades celulares mediadas pelo BCG em células fagocíticas (Chavéz-Galán *et al.*, 2016). De acordo com Butler *et al.*, (2012), a quantidade de células mortas é influenciada pela virulência, e a habilidade para controlar apoptose/necrose das células hospedeiras é influenciada pelas características da bactéria independente da habilidade de replicar nos macrófagos.

Não existe consenso na literatura quanto à multiplicidade de infecção usada para os ensaios de infecção de micobactérias em macrófagos, podendo variar entre 1:1 (Sousa-Vasconcelos *et al.*, 2015); 2:1 (Guerreiro *et al.*, 2013) e 10:1 (Riendeau & Kornfeld, 2003). Alguns trabalhos mostram que não há diferença. Chavéz-Galán *et al.* (2016) comparou a resposta de macrófagos RAW 264,7 após infecção com BCG Pasteur usando MOI de 1 e de 0.1 (a

última considerada uma dose muito baixa de infecção). O estudo avaliou se baixas doses seriam suficientes para ativar os macrófagos sem interferir na viabilidade e integridade mitocondrial e avaliou ainda se, quando submetidos à infecções com MOI baixas, macrófagos estariam aptos a manter suas atividades funcionais. Os resultados mostraram que baixas doses de BCG já constituem um modelo de infecção *in vitro* para estudos de interações entre BCG e macrófagos.

É sabido que a resposta imunológica envolvida na proteção contra *M. tb* é a resposta do tipo celular, com ampla participação de células T_{H1} e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ . Juntas essas citocinas aumentam a capacidade microbicida dos macrófagos a partir do aumento da produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio que tornam hostil o ambiente intracelular. Essas citocinas também estão envolvidas na formação de granulomas, que são estruturas importantes na contenção da disseminação do bacilo.

A citocina pró-inflamatória IL-1 β é um importante mediador de inflamação e desempenha uma função na resistência às infecções com *M. tb*. Vários estudos têm enfatizado a importância da região genômica RD1, ausente em todas as cepas de BCG, na modulação da secreção de IL-1 β por células infectadas. *M. marinum* Δ RD-1 e *M. bovis* BCG, deficientes de sistemas funcionais de secreção do tipo ESX-1 devido à deleção RD1, são prejudicados na capacidade de induzir a secreção de IL-1 β madura *in vitro* (revisto em Kirshnan, Robertson & Thwaites, 2013). A ausência da RD1 em cepas de BCG

pode ser uma razão para a baixa secreção dessa citocina pelas células infectadas.

Observamos que a partir de 24 horas ocorre o aumento na produção de IL-6 (Figura 4.20). Defilippi *et al.* (1987) descreveram que macrófagos incubados com BCG morto por calor estavam mais aptos a produzir IL-6 do que aqueles infectados com BCG vivo. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que desempenha uma gama de funções nos efeitos imunológicos celulares e humorais relacionados à inflamação, defesa do hospedeiro e injúria tecidual; além disso, IL-6 desempenha papel importante no metabolismo de carboidratos e lipídios por aumentar a lipólise e a liberação de ácidos graxos livres e glicerol (Volp *et al.*, 2008).

Nossos resultados mostram que a única citocina que mostrou secreção maior em células infectadas com M::05c em relação à MΔ05c foi a IL-6. Esse aumento de IL-6 foi significativamente maior (**p>0,001 para MOI 1:1 e *p>0,05 para MOI 10:1) no tempo de 72 horas apenas para infecção com a cepa M::05c. (Figuras 20A e 20B). Esse dado se torna interessante quando se relaciona com o fato de que nessa cepa (M::05c) a expressão da proteína Rv3406 não é observada devido à complementação com o repressor transcricional Rv3405c funcional. O aumento da expressão da IL-6 poderia, dessa forma, compensar a perda da sulfatase através da sua atuação no metabolismo lipídico, liberando ácidos graxos.

A ativação de macrófagos induzida por BCG tem sido associada com produção de TNF- α , citocina importante nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Garcia *et al.*, 2011), por ser importante no controle da infecção

micobacteriana *in vivo* e *in vitro*. Ao contrário do que está descrito na literatura, nossos resultados não mostram aumento significativo de TNF- α ao longo do tempo estudado. Também não observamos diferenças relacionadas ao MOI usado nas infecções (Figuras 4.21A e 4.21B), exceto pelo tempo de 6 horas, que apresentou diferença significativa observada em macrófagos infectados por M Δ 05c.

Por outro lado, de acordo com Keane, Remold & Kornfeld (2000) a indução de IL-10 por *M. tb* leva à inibição de TNF- α , e esse mecanismo pode ser importante para que o bacilo escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Com relação à expressão de IL-10, nossos resultados indicam elevada secreção de IL-10 ao longo da cinética avaliada e também em relação às multiplicidades de infecção (Figura 4.22), sem apontar diferenças significativas entre as cepas. Alguns estudos têm mostrado que a vacina BCG é capaz de induzir resposta supressora, com a participação de células T_{reg} e produção de IL-10 (possivelmente por essas células T_{reg}) (revisto em Burl *et al.*, 2010).

A secreção de quimiocinas por macrófagos derivados de células THP-1 infectados com BCG pode ser um importante mecanismo da imunidade inata. Méndez-Samperio *et al.* (2003) observaram níveis significativamente elevados de RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β quando monócitos foram estimulados com BCG. Nós detectamos produção de MIP-1 β com maior expressão no tempo de 24 horas pós-infecção observada para infecções usando MOI de 10:1 e de 1:1 (Figura 4.23) e esses resultados concordam com Sousa-Vasconcelos *et al.* (2015). Entretanto, não detectamos diferenças significativas entre as cepas.

Juntos nossos resultados revelam produção de citocinas pró-inflamatórias que estariam atuando na tentativa de controlar a infecção pela micobactéria. Nossos resultados não foram capazes de demonstrar diferença significativa com relação às multiplicidades de infecção, concordando mais uma vez com Chávez-Galán (2016) que afirma que doses muito pequenas de infecção já são suficientes para induzir resposta imunológica. Além da produção de citocinas, um dos principais mecanismos microbicidas exercido pelos macrófagos é a produção de óxido nítrico (NO). A deficiência de NO parece estar relacionada com a reativação de microrganismos como *M. tb* (revisto em Fang, 1997). Não fomos capazes de detectar NO nas nossas amostras a partir do método de Griess (dados não mostrados).

Dados anteriores do nosso grupo (Galvão *et al.*, 2014) demonstraram, em cultivos axênicos, a presença da proteína Rv3406 em extratos da cepa BCG portadora do vetor vazio, mas não na cepa complementada com o gene funcional *rv3405c*. Esses dados foram confirmados no presente estudo quando comparamos a presença da proteína Rv3406 após infecção de macrófagos por 96 horas com as cepas recombinantes $M\Delta 05c$ e $M::05c$ (Figura 4.24B). As condições testadas *in vitro* no nosso estudo não foram capazes de induzir a expressão do gene *rv3406* e, conseqüentemente, a expressão da proteína nas cepas $M::05c$.

Nosso estudo se torna interessante ao comparar duas cepas de BCG Moreau cuja única diferença é a complementação com um único regulador transcricional, representando assim o mesmo *background* genético. Esse estudo não poderia ser feito, por exemplo, comparando cepas de BCG Moreau

e Pasteur porque elas apresentam um complexo painel de diferenças genômicas, além da ausência ou presença da *rv3405c*, respectivamente.

É importante ressaltar que, na construção utilizada para complementação, o gene *rv3405c* está fora do seu contexto cromossômico original, uma vez que se encontra carregado por um plasmídeo (pUS977), acarretando em um aumento do número de cópias do gene e controle transcricional distinto.

Nossos dados não nos permitiram observar diferenças quanto à expressão gênica dos outros alvos selecionados como potencialmente regulados por Rv3405c. No entanto, outras abordagens de avaliação da expressão global (RNA seq, por exemplo) poderiam ser usadas para mapear e selecionar novos alvos.

Nosso grupo vem ao longo dos últimos anos contribuindo na geração de conhecimentos a respeito da cepa vacinal de BCG usada no Brasil, BCG Moreau, através do sequenciamento completo do seu genoma (Gomes *et al.*, 2011), do estudo dos perfis proteômicos do filtrado de cultura (Bêrredo-Pinho *et al.*, 2011) e de superfície celular (Pagani-Duarte *et al.*, manuscrito em preparação) comparando as cepas BCG Moreau e Pasteur e através da análise da ação do repressor transcricional *rv3405c* sobre o gene adjacente *rv3406* (Galvão *et al.*, 2104). Assim esperamos fornecer, através dos resultados aqui apresentados, novos subsídios que possam agregar informações importantes ao conhecimento já existente e que, juntos, esses trabalhos possam levar à melhor compreensão dos mecanismos imunogênicos e do comportamento da cepa vacinal brasileira, BCG Moreau.

6. Conclusões

- A presença do repressor transcricional Rv3405c não afeta a morfologia das colônias de BCG obtidas de meio axênico ou de macrófagos infectados;
- A ausência do repressor transcricional *rv3405c* funcional conferiu melhor viabilidade ao BCG tanto em meio axênico quanto no ambiente intracelular de macrófagos da linhagem humana THP-1, sugerindo um possível ganho funcional potencialmente relacionado à expressão constitutiva de Rv3406.
- Rv3405c é capaz de se ligar à região do gene *rv0405* que contém o motivo palindrômico identificado na região intergênica *rv3405c-rv3406*.
- Análises preliminares, através de RT-PCR e RT-qPCR, não identificaram diferenças significativas na expressão dos outros quatro alvos selecionados como potencialmente regulados por Rv3405c;
- A presença do repressor transcricional Rv3405c não afeta a viabilidade dos macrófagos infectados com as cepas de BCG nas condições testadas;
- Diferenças relativas ao perfil de secreção das citocinas avaliadas foram observadas em alguns tempos de infecção, sendo na maioria dos casos mais elevados nas células infectadas por $M\Delta 05c$;
- A secreção da citocina IL-6 foi maior em células infectadas pela cepa complementada com o fator transcricional funcional;
- A expressão da proteína Rv3406 foi detectada em amostras de BCG $M\Delta 05c$ obtidas de macrófagos 96 horas após a infecção; entretanto, essa mesma condição não foi capaz de induzir a expressão da proteína na cepa complementada.

6. *Perspectivas*

1. Mapear o regulon de Rv3405c, seja através da busca de novos alvos que possuam sequências homólogas ao motivo palindrômico, ou da análise global de expressão gênica (por exemplo, RNAseq) comparando as 2 cepas de BCG);

2. Encontrar condições que induzam expressão de Rv3406 e identificar o agente indutor, possibilitando compreender melhor o possível papel desta proteína no favorecimento da viabilidade de BCG Moreau (tanto em cultura axênica quanto no ambiente intracelular).

8. Referências Bibliográficas

ABDALLAH AM, GEY VAN PITTIUS NC, CHAMPION PA, COX J, LUIRINK J, VANDENBROUCKE-GRAULS CM, APPELMELK BJ, BITTER W. Type VII secretion - mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol.*, 2007 Nov; 5 (11) : 883-91.

ABDALLAH AM, HILL-CAWTHORNE GA, OTTO TD, COLL F, GUERRA-ASSUNÇÃO JA, GAO G, NAEEM R, ANSARI H, MALAS TB, ADROUB SA, VERBOOM T, UMMELS R, ZHANG H, PANIGRAHI AK, MCNERNEY R, BROSCHE R, CLARK TG, BEHR MA, BITTER W & PAIN A. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep.*, 2015, 5 : 15443.

ABUHAMMAD A. Cholesterol metabolism: a potential therapeutic target in mycobacteria. *Br. J. Pharmacol.*, 2017, Jul; 174 (14) : 2194-2208.

AGUILO JI, ALONSO H, URANGA S, MARINOVA D, ARBUÉS A, DE MARTINO A, ANEL A, MONZON M, BADIOLA J, PARDO J, BROSCHE R & MARTIN C. ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol.* 2013 Dec;15(12):1994-2005.

ASSIS A. Estado actual da vacinação antituberculose pelo BCG no Rio de Janeiro. Conferência realizada em 5 de janeiro de 1932 na Liga Brasileira contra a Tuberculose. Oficinas Graphicas do Jornal do Brasil, 1932. Rio de Janeiro.

BALHANA RJ, SINGLA A, SIKDER MH, WITHERS M, KENDALL SL. Global analyses of TetR family transcriptional regulators in mycobacteria indicates conservation across species and diversity in regulated functions. *BMC Genomics*, 2015, 16 : 479.

BAÑULS AL, SANOU A, AHN NTV & GODREUIL S. *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *J. Med. Microbiol.*, 2015, 64 (11) : 1261-9.

BEHR M, WILSON MA, GILL WP, SALAMON H, SCHOOLNIK GK, RANE S & SMALL PM. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole genome DNA microarray. *Science* 284:1520–1523.

BEHR MA & SMALL PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine*, 1999, 17 : 915-922.

BENÉVOLO-DE-ANDRADE TC, MONTEIRO-MAIA R, COSGROVE C, CASTELLO-BRANCO LR. BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis--review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 2005, 100 (5) : 459-65.

BERRÊDO-PINHO M, KALUME DE, CORREA PR, GOMES LH, PEREIRA MP, DA SILVA RF, CASTELLO-BRANCO LR, DEGRAVE WM, MENDONÇA-LIMA L. Proteomic profile of culture filtrate from the Brazilian vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Moreau compared to *M. bovis* BCG Pasteur. BMC Microbiol., 2011, 11 : 80.

BLACK PA, WARREN RM, LOUW GE, VAN HELDEN PD, VICTOR TC & KANA BD. Energy metabolism and drug efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother., 2014; 58 (5) : 2491-503.

BOTTAI D, STINEAR TP, SUPPLY P & BROSCHE R. Mycobacterial pathogenomics and evolution. In: HATFULL GF & JACOBS WR (ed). Molecular Genetics of Mycobacteria. Washington DC. ASM Press. 2014. Capítulo 2 : 27-48.

BRENNAN PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb). 2003; 83 (1-3) : 91-7.

BRODIN P, EIGLMEIER K, MARMIESSE M, BILLAULT A, GARNIER T, NIEMANN S, COLE ST, BROSCHE R. Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis identifies *Mycobacterium microti* as a natural ESAT-6 deletion mutant. Infect. Immun., 2002, 70 (10) : 5568-78.

BROSCHE R. *et al.* Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. Comp. Funct. Genom. (Yeast), 2000, 17, 111–123.

BROSCHE R, GORDON SV, MARMIESSE M, BRODIN P, BUCHRIESER C, EIGLMEIER K, GARNIER T, GUTIERREZ C, HEWINSON G, KRENER K, PARSONS LM, PYM AS, SAMPER S, VAN SOOLINGEN D & COLE ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99 (6) : 3684–3689.

BROSET E, MARTÍN C & GONZALO-ASENSIO J. Evolutionary landscape of the *Mycobacterium tuberculosis* complex from the viewpoint of PhoPR: Implications for virulence regulation and application to vaccine development. MBio, 2015, 6 (5) : 1-15.

BURL S, ADETIFA UJ, COX M, TOURAY E, OTA MO, MARCHANT A, WHITTLE H, MCSHANE H, ROWLAND-JONES SL & FLANAGAN KL. Delaying bacillus Calmette-Guérin vaccination from birth to 4 1/2 months of age reduces postvaccination Th1 and IL-17 responses but leads to comparable mycobacterial responses at 9 months of age. J. Immunol., 2010 Aug 15; 185 (4) : 2620-8

BUTLER RE, BRODIN P, JANG J, JANG MS, ROBERTSON BD, GICQUEL B & STEWART GR. The balance of apoptotic and necrotic cell death

in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages is not dependent on bacterial virulence. PLoS One.2012; 7 (10) : e47573.

CALMETTE A. Preventive vaccination against tuberculosis with BCG. Proc R Soc Med., 1931, Sep; 24 (11) : 1481–1490.

CHÁVEZ-GALÁN L, VESIN D, MARTINVALET D & GARCIA I. Low Dose BCG Infection as a Model for Macrophage Activation Maintaining Cell Viability. J. Immunol. Res., 2016 : 4048235.

CHEON SA, CHO HH, KIM J, LEE J, KIM HJ & PARK TJ. Recent tuberculosis diagnosis toward the end TB strategy. J. Microbiol. Methods., 2016, 123 : 51-61.

COLE ST, BROSCHE R, PARKHILL J, GARNIER T, CHURCHER C, HARRIS D, GORDON SV, EIGLMEIER K, GAS S, BARRY CE 3RD, TEKAIA F, BADCOCK K, BASHAM D, BROWN D, CHILLINGWORTH T, CONNOR R, DAVIES R, DEVLIN K, FELTWELL T, GENTLES S, HAMLIN N, HOLROYD S, HORNSBY T, JAGELS K, KROGH A, MCLEAN J, MOULE S, MURPHY L, OLIVER K, OSBORNE J, QUAIL MA, RAJANDREAM MA, ROGERS J, RUTTER S, SEEGER K, SKELTON J, SQUARES R, SQUARES S, SULSTON JE, TAYLOR K, WHITEHEAD S & BARRELL BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature, 1998, 393 (6685) : 537-44.

CONSTANT P, PEREZ E, MALAGA W, LANEELLE MA, SAUREL O, DAFRE M & GUILHOT C. Role of the pks15/1 gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the pks15/1 gene. J. Biol. Chem., 2002, 277:38148–38158.

COOPER AM. T cells in mycobacterial infection and disease. Curr. Opin. Immunol., 2009, 21 (4) : 378-384.

COPIN R, COSCOLLÁ M, EFSTATHIADIS E, GAGNEUX S & ERNST JD. Impact of in vitro evolution on antigenic diversity of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG). Vaccine, 2014, 32 (45) : 5998-6004.

COSCOLLA M & GAGNEAUX S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. Semin. Immunol., 2014, 26 (6) : 431-44.

COX JS, CHEN B, MCNEIL M & JACOBS WRJr. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Nature, 1999, 402 : 79–83.

CUTHBERTSON L & NODWELL JR. The TetR family of regulators. Microbiol Mol. Biol. Rev., 2013, 77 (3) : 440-75.

DAIGNEAULT M, PRESTON JA, MARRIOTT HM, WHYTE MK & DOCKRELL DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-

stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. PLoS One. 2010, Jan 13; 5 (1) : e8668.

DEAN GS, RHODES SG, COAD M, WHELAN AO, COCKLE PJ, CLIFFORD DJ, HEWINSON RG & VORDERMEIER HM. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. Infect Immun., 2005 Oct; 73 (10) : 6467-71.

DEFILIPPI P, POUPART P, TAVERNIER J, FIERIS W & CONTENT J. Induction and regulation of mRNA encoding 26-kDa protein in human cell lines treated with recombinant human tumor necrosis factor. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 4557-4561.

DI PIETRANTONIO T, CORREA JA, ORLOVA M, BEHR MA & SCHURR E. Joint effects of host genetic background and mycobacterial pathogen on susceptibility to infection. Infect Immun., 2011, 79 (6) : 2372-8.

DODD CE, PYLE CJ, GLOWINSKI R, RAJARAM MV & SCHLESINGER LS. CD36-Mediated Uptake of Surfactant Lipids by Human Macrophages Promotes Intracellular Growth of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Immunol., 2016, 197 (12) : 4727-4735.

DOERKS T, VAN NOORT V, MINGUEZ P & BORK P. Annotation of the *M. tuberculosis* hypothetical orfeome: adding functional information to more than half of the uncharacterized proteins. PLoS One, 2012, 7 (4) : e34302.

FANG FC. Perspectives Series: Host/Pathogen Interaction. Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. J. Clin. Invest., 1997, 99 (12) : 2818–2825.

FALLOWS D, PEIXOTO B, KAPLAN G & MANCA C. *Mycobacterium leprae* alters classical activation of human monocytes *in vitro*. J Inflamm (Lond)., 2016, 13 : 8.

FRIEDEN TR, STERLING TR, MUNSIF SS, WATT CJ & DYE C. Tuberculosis. Lancet, 2003, 362 : 887–99.

GALVÃO TC, LIMA CR, GOMES LH, PAGANI TD, FERREIRA MA, GONÇALVES AS, CORREA PR, DEGRAVE WM, MENDONÇA-LIMA L. The BCG Moreau RD16 deletion inactivates a repressor reshaping transcription of an adjacent gene. Tuberculosis (Edinb), 2014, 94 (1) : 26-33.

GARCIA I, OLLEROS ML, QUESNIAUX VFJ *et al.* Roles of soluble and membrane TNF and related ligands in mycobacterial infections: effects of selective and non-selective TNF inhibitors during infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2011; 691 : 187–201. doi: 10.1007/978-1-4419-6612-4_20.

GARTON NJ, CHRISTENSEN H, MINNIKIN DE, ADEGBOLA RA & BARER MR. Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria *in vitro* and in sputum. *Microbiology*. 2002 Oct; 148 (Pt 10) : 2951-8.

GARTON NJ, WADDELL SJ, SHERRATT AL, LEE SM, SMITH RJ, SENNER C, HINDS J, RAJAKUMAR K, ADEGBOLA RA, BESRA GS BUTCHER PD & BARER MR. Cytological and transcript analyses reveal fat and lazy persister-like bacilli in tuberculous sputum. *PLoS Med.*, 2008 Apr; 5 (4) : e75.

GOMES LH, OTTO TD, VASCONCELLOS EA, FERRÃO PM, MAIA RM, MOREIRA AS, FERREIRA MA, CASTELLO-BRANCO LR, DEGRAVE WM, MENDONÇA-LIMA L. Genome sequence of *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, the Brazilian vaccine strain against tuberculosis. *J. Bacteriol.*, 2011, 193 (19) : 5600-1.

GUERREIRO LT, ROBOTOM-FERREIRA AB, RIBEIRO-ALVES M, TOLEDO-PINTO TG, ROSA BRITO T, ROSA PS, SANDOVAL FG, JARDIM MR, ANTUNES SG, SHANNON EJ, SARNO EN, PESSOLANI MC, WILLIAMS DL & MORAES MO. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. *PLoS One.*, 2013, Jun 14;8 (6): e64748.

HILLEN W & BERENS C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol.*, 1994; 48 : 345-69.

HISERT KB, KIRKSEY MA, GOMEZ JE, SOUSA AO, COX JS, JACOBS WR JR, NATHAN CF & MCKINNEY JD. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* counterimmune (cim) mutants in immunodeficient mice by differential screening. *Infect. Immun.*, 2004, 72 : 5315–5321.

HONDA I, SEKI M, IKEDA N, YAMAMOTO S, YANO I, KOYAMA A & TOIDA I. Identification of two subpopulations of *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) Tokyo172 substrain with different RD16 regions. *Vaccine*. 2006 Jun 5;24(23):4969-74.

HORSBURGH CR, BARRY CE III, & LANGE C. Treatment of tuberculosis. *N Engl. J. Med.*, 2015, 373 : 2149-60.

HUANTE MB, GUPTA S, CALDERON VC, KOO SJ, SINHA M, LUXON BA, GARG NJ & ENDSLEY JJ. Differential inflammasome activation signatures following intracellular infection of human macrophages with *Mycobacterium bovis* BCG or *Trypanosoma cruzi*. *Tuberculosis* (Edinb). 2016 Dec; 101S : S35-S44.

JANSEN, H. J., HART, C. A., RHODES, J. M., SAUNDERS, J. R. & SMALLEY, J. W. A novel mucin-sulphatase activity found in *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.*, 1999, 48, 551–557.

JOUNG SM & RYOO S. BCG vaccine in Korea. *Clin. Exp. Vaccine Res.*, 2013 Jul; 2 (2) : 83-91.

KAUFMANN SHE. Editorial. Semin. Immunol., 2014, 26 : 429-430.

KAUFMANN SH. EFIS lecture. Immune response to tuberculosis: How to control the most successful pathogen on earth. Immunol Lett. 2016 Jul;175:50-7.

KEANE JH, REMOLD G & KORNFELD H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. J. Immunol., 2000, 164 : 2016-2020.

KERTESZ MA. Riding the sulfur cycle--metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev., 2000, Apr; 24 (2) : 135-75.

KRISHNAN N, ROBERTSON BD & THWAITES G. Pathways of IL-1 β secretion by macrophages infected with clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains. Tuberculosis (Edinb). 2013 Sep; 93 (5) : 538-47.

KONDO E & KANAI K.. A suggested role of a host-parasite lipid complex in mycobacterial infection. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 1976, 29 : 199–201.

KORB VC, CHUTURGOON AA & MOODLEY D. *Mycobacterium tuberculosis*: manipulator of protective immunity. Int. J. Mol. Sci., 2016, 17 (131).

LAGRANDERIE M, CHAVAROT P, BALAZUC AM, MARCHAL G. Immunogenicity and protective capacity of *Mycobacterium bovis* BCG after oral or intragastric administration in mice. Vaccine. 2000; 18 (13) : 1186-95.

LAGRANGE PH. Vaccination antituberculeuse par le BCG: historique d'une découverte et de ses controverses. Médecin Sciences, 1998, 14: 314-319.

LEUNG AS, TRAN V, WU Z, YU X, ALEXANDER DC, GAO GF, ZHU B, LIU J. Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. BMC Genomics., 2008, 9 : 413.

LEW JM, KAPOPOULOU A, JONES LM & COLE ST. Tuberculist – 10 years after. Tuberculosis, 2011, 91 : 1-7.

MÉNDEZ-SAMPERIOP, VÁZQUEZ A & AYALA H. Infection of human monocytes with *Mycobacterium bovis* BCG induces production of CC-chemokines. J. Infect., 2003, 47: 139-147.

MENDOZA-CORONEL E & CASTAÑÓN-ARREOLA M. Comparative evaluation of in vitro human macrophage models for mycobacterial infection study. Pathog Dis., 2016, Aug; 74 (6).

MINCH KJ, RUSTAD TR, PETERSON EJR, WINKLER J, REISS DJ, MA S, HICKEY M, BRABANT W, MORRISON B, TURKARSLAN S, MAWHINNEY C, GALAGAN JE, PRICE ND, BALIGA NS, SHERMAN DR. The DNA-binding network of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Commun., 2015 Jan 12; 6 : 5829.

MOLINA-TORRES CA, CASTRO-GARZA J, OCAMPO-CANDIANI J, MONOT M, COLE ST, VERA-CABRERA L. Effect of serial subculturing on the genetic composition and cytotoxic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 2010 Apr; 59 (Pt 4) : 384-9.

MONTEIRO-MAIA R & PINHO RT. Oral bacillus Calmette-Guérin vaccine against tuberculosis: why not? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014, 109 (6) : 838-45.

MOUGOUS JD, GREEN RE, WILLIAMS SJ, BRENNER SE & BERTOZZI CR. Sulfotransferases and Sulfatases in Mycobacteria. Chemistry & Biology, 2002, Vol. 9, 767–776.

MOSTOWY S, TSOLAKI AG, SMALL PM & BEHR MA.. The *in vitro* evolution of BCG vaccines. Vaccine, 2003, 21 : 4270–4274.

NERES J, HARTKOORN RC, CHIARELLI LR, GADUPUDI R, PASCA MR, MORI G, VENTURELLI A, SAVINA S, MAKAROV V, KOLLY GS, MOLteni E, BINDA C, DHAR N, FERRARI S, BRODIN P, DELORME V, LANDRY V, DE JESUS LOPES RIBEIRO AL, FARINA D, SAXENA P, POJER F, CARTA A, LUCIANI R, PORTA A, ZANONI G, DE ROSSI E, COSTI MP, RICCARDI G & COLE ST. 2-Carboxyquinoxalines kill *Mycobacterium tuberculosis* through noncovalent inhibition of DprE1. ACS Chem. Biol., 2015, 10 (3) : 705-14.

PYM AS, BRODIN P, BROSCHE R, HUERRE M & COLE ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. Mol. Microbiol., 2002, 46 (3) : 709-17.

QUADRI LEN. Biosynthesis of mycobacterial lipids by polyketide synthases and beyond. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2014; 9238: 179–211.

RAGHAVAN S, MANZANILLO P, CHAN K, DOVEY C & COX JS. Secreted transcription factor controls *Mycobacterium tuberculosis* virulence. Nature. 2008, 454 (7205) : 717-21.

RIENDEAU CJ & KORNFELD H. THP-1 Cell Apoptosis in Response to Mycobacterial Infection. Infect Immun., 2003 Jan; 71 (1) : 254–259.

RITZ N & CURTIS N. Mapping the global use of different BCG vaccine strains. Tuberculosis (Edinb), 2009, 89 (4) : 248-51.

RIVERA-MARRERO CA, RITZENTHALER JD, NEWBURN SA, ROMAN J & CUMMINGS RD. Molecular cloning and expression of a novel glycolipid sulfotransferase in *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology. 2002, 148 (Pt 3) : 783-92.

ROUSSEAU C, WINTER N, PIVERT E, BORDAT Y, NEYROLLES O, AVÉ P, HUERRE M, GICQUEL B, JACKSON M. Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of

reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cell Microbiol.*, 2004, 6 : 277–287.

RUE-ALBRECHT K, MAGEE DA, KILICK KE, NALPAS NC, GORDON SV & MACHUGH DE. Comparative functional genomics and the bovine macrophage response to strains of the *Mycobacterium* genus. *Front. Immunol.*, 2014, 5 : 1-14.

SAKULA A. BCG: who were Calmette and Guérin? *Thorax*, 1983, 38 : 806-812.

SCHNAPPINGER D & EHRT S. Regulated expression systems for *Mycobacteria* and their applications. In: HATFULL GF & JACOBS WR (ed). *Molecular Genetics of Mycobacteria*. Washington DC. ASM Press, 2014. Capítulo 11 : 225-240.

SCHOREY JS & SCHLESINGER LS. Innate immune responses to tuberculosis. *Microbiol. Spectr.*, 2016; 4 (6).

SCHWAB U, ROHDE KH, WANG Z, CHESS PR, NOTTER RH & RUSSELL DG. Transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to lung surfactant. *Microb. Pathog.*, 2009 Apr; 46 (4) : 185-93.

SECANELLA-FANDOS S, LUQUIN M & JULIÁN E. Connaught and Russian strains showed the highest direct antitumor effects of different *Bacillus Calmette-Guérin* substrains. *J. Urol.*, 2013, 189 (2) : 711-8.

SEELIGER J & MOODY DB. Monstrous *Mycobacterial* lipids. *Cell Chemical Biology* 23, February 18, 2016. 207–209.

SHI L, EUGENIN EA & SUBBIAN S. Immunometabolism in Tuberculosis. *Front. Immunol.*, 2016, 7:150.

SIMEONE R, BOTTAI D & BROSCHE R. ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol.* 2009 Feb; 12 (1) : 4-10.

SIRAKOVA TD, THIRUMALA AK, DUBEY VS, SPRECHER H & KOLATTUKUDY PE. The *Mycobacterium tuberculosis* *pkc2* gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 : 16833–16839.

SOGI KM, GARTNER ZJ, BREIDENBACH MA, APPEL MJ, SCHELLE MW & BERTOZZI CR. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3406 is a type II alkyl sulfatase capable of sulfate scavenging. *PLoS One.*, 2013, 8 (6) : e65080.

SOTGIU G, SULIS G & MATTEELLI A. Tuberculosis - a World Health Organization Perspective. *Microbiol. Spectr.*, 2017 Jan; 5 (1).

SOUSA-VASCONCELOS PS, SEGUINS WS, LUZ ES & PINHO RT. Pattern of cytokine and chemokine production by THP-1 derived macrophages in response to live or heat-killed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin Moreau strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015, 110 (6) : 809-13.

SUCCI RCM. BCG. In: CK Farhat, Fundamentos e Prática das Imunizações em Clínica Médica e Pediatria, Atheneu, 1985. Rio de Janeiro, p. 27-41

TRAN V, AHN SK, NG M, LI M & LIU J. Loss of Lipid Virulence Factors Reduces the Efficacy of the BCG Vaccine. *Sci Rep.*, 2016, 6 : 29076.

VOLP, ACP, ALFENAS, RCG, COSTA, NMB, MINIM, VPR, STRINGUETA, PC & BRESSAN, J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabo.*, 2008, 52 (3), 537-549.

YANG M, GAO CH, HU J, ZHAO L, HUANG Q & HE ZG. InbR, a TetR family regulator, binds with isoniazid and influences multidrug resistance in *Mycobacterium bovis* BCG. *Sci Rep.*, 2015, 5 : 13969.

WHO. Global tuberculosis report 2015. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf. Acessado em: janeiro, 2017.

WHO. Global tuberculosis report 2016. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acessado em: janeiro, 2017.

ZHANG W, ZHANG Y, ZHENG H, PAN Y, LIU H, DU P, WAN L, LIU J, ZHU B, ZHAO G, CHEN C & WAN K. Genome sequencing and analysis of BCG vaccine strains. *PLoS One*, 2013, 8 : e71243.

ZHANG L, RU HW, CHEN FZ, JIN CY, SUN RF, FAN XY, GUO M, MAI JT, XU WX, LIN QX & LIU J. Variable Virulence and Efficacy of BCG Vaccine Strains in Mice and Correlation With Genome Polymorphisms. *Mol Ther.* 2016, 24 (2) : 398-405.