

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LEANDRO SANTIAGO EMMERICK

Micobactérias não-tuberculosas isoladas da Mata Atlântica: aspectos genéticos, bioquímicos e identificação de antígenos compartilhados com a vacina BCG

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

Orientadora: Prof. Dr^a. Leila de Mendonça Lima

RIO DE JANEIRO

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ – RJ

E54 Emmerick, Leandro Santiago

Micobactérias não-tuberculosas isoladas da Mata Atlântica: aspectos genéticos, bioquímicos e identificação de antígenos compartilhados com a vacina BCG. – Rio de Janeiro: 2013.

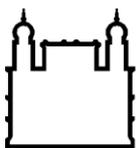
xxii, 119 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013.

Bibliografia: f. 81-105

1. Micobactérias não tuberculosas 2. Sistema de expressão 3. Vacina BCG 4. Caracterização microbiológica

CDD 579.374



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LEANDRO SANTIAGO EMMERICK

Micobactérias não-tuberculosas isoladas da Mata Atlântica: aspectos genéticos, bioquímicos e identificação de antígenos compartilhados com a vacina BCG.

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Leila de Mendonça Lima

Aprovada em: 01/07/2013

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Patricia Cuervo Escobar (IOC/FIOCRUZ) – Revisora e Presidente

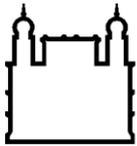
Prof. Dr. Cristina Viana Niero (UNIFESP) – Titular

Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros (FIOCRUZ) – Titular

Prof. Dr. Raquel Lima Figueiredo Teixeira (IOC/FIOCRUZ) – Suplente

Prof. Dr. Adeílton Alves Brandão (IOC/FIOCRUZ) – Suplente

Rio de Janeiro, 01 de julho de 2013



Ministério da Saúde

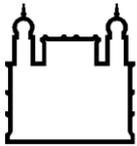
FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Micobactérias não-tuberculosas isoladas da Mata Atlântica: aspectos genéticos, bioquímicos e identificação de antígenos compartilhados com a vacina BCG.

RESUMO

O gênero *Mycobacterium* possui mais de 160 espécies, dentre elas importantes patógenos como *M. leprae*, *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Embora muito se conheça sobre estes patógenos, poucos estudos se concentraram na caracterização detalhada de micobactérias não-tuberculosas (MNT), que apresentam distribuição ambiental variada e são oligotróficas. Embora muitas sejam consideradas saprófitas, acredita-se que a infecção sub-clínica de animais e humanos esteja subestimada. A infecção por MNT ambientais é considerada como um dos fatores que modulam a resposta protetora conferida pela vacina BCG. Neste contexto, o presente estudo tem como foco a caracterização das MNT de crescimento rápido provenientes da Coleção de Bactérias da Mata Atlântica (CBMA) do IOC/FIOCRUZ, com dois objetivos principais: (1) caracterizar espécies que possam ser utilizadas no desenvolvimento de um novo sistema de expressão de proteínas heterólogas e (2) identificar antígenos e vias metabólicas compartilhadas entre espécies patogênicas e saprófitas. Os isolados obtidos da CBMA/IOC foram cultivados em meios LB contendo Tween 80, sob agitação a 25 °C. Foram geradas curvas de crescimento a partir da leitura da DO a 600 nm de triplicatas biológicas, e determinadas características morfológicas. Diversos testes bioquímicos foram realizados para uma melhor caracterização desses isolados. O perfil de secreção de proteínas ao longo do crescimento foi verificado por SDS-PAGE, a presença de proteases secretadas avaliada por zimografia e a presença e atividade de celulases foi verificada através de western blot, zimografia e ensaio enzimático. A capacidade de transformação por DNA plasmidial foi avaliada por eletroporação. Também foram propostos agrupamentos filogenéticos com base na análise de sequências de regiões dos genes 16S rRNA (*rrs*) e *hsp65*. Em paralelo, foi verificada por *western blot* a presença de antígenos micobacterianos comuns, já descritos como tendo papel importante na geração de resposta imune (Mpt64, Mpt70, Mpt83 e antígenos do complexo 85) ou no metabolismo e sobrevivência do *M. tuberculosis* (GlnA1 e HspX). O perfil de crescimento e as características morfológicas e bioquímicas dos isolados parecem confirmar o agrupamento filogenético proposto. Atividade celulásica foi observada em apenas dois isolados, apesar de todos expressarem esta proteína, e não foi encontrada atividade proteásica no filtrado de cultura nas condições testadas. Todos os isolados são transformáveis, mas apresentam diferenças quanto à eficiência e integridade do vetor. As análises por *western blot* revelaram a presença de proteínas do complexo 85, Mpt70 e GlnA1 e ausência de reatividade para os antígenos Mpt64, Mpt83 e HspX. Desse modo, três isolados foram selecionados para prosseguir com o desenvolvimento do novo sistema de expressão de proteínas heterólogas secretadas. A presença de alguns antígenos compartilhados fornecem novos subsídios para elucidar a relação entre MNT e vacina BCG.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Non-tuberculous mycobacteria isolated from the Atlantic forest: genetic and biochemical aspects and identification of antigens shared with the BCG vaccine.

ABSTRACT

The genus *Mycobacterium* has more than 160 species, among them important pathogens such as *M. leprae*, *M. tuberculosis* and *M. bovis*. Although much is known about these pathogens, few studies have focused on the detailed characterization of non-tuberculous mycobacteria (NTM), which present wide environmental distribution and are oligotrophic. While many are considered saprophytes, it is believed that the subclinical infection of humans and animals is underestimated. The environmental NTM infection is considered as one of the factors that modulate the protective response provided by BCG vaccine. In this context, the present study focuses on the characterization of rapidly growing MNT from the Atlantic Forest Bacterial Collection (CBMA - Coleção de Bactérias da Mata Atlântica, IOC / FIOCRUZ), with two main objectives: (1) characterize species which may be used to develop a new system for heterologous protein expression and (2) to identify antigens and metabolic pathways shared between pathogenic species and saprophytes. The isolates obtained from CBMA/IOC were grown in LB media containing Tween 80, under agitation, at 25 °C. Growth curves were generated from the reading of the OD at 600 nm of biological triplicates, and certain morphological characteristics were determined. Several biochemical tests were performed to better characterize these isolates. The profile of secreted proteins was verified by SDS-PAGE along the growth curves, the presence of secreted proteases evaluated by zymography and the presence and activity of cellulases was verified by western blot, enzymatic assay and zymography. The transformation capacity of the individual isolates was evaluated by electroporation of plasmid DNA. Phylogenetic groupings were also proposed based on sequencing of regions from the 16S rRNA (*rrs*) and *hsp65* genes. In parallel, the presence of shared mycobacterial antigens described as playing important roles in generating immune responses (Mpt64, Mpt70, Mpt83 and antigen 85 complex) or in metabolism and survival of *M. tuberculosis*, was verified by western blot. The growth profile and the morphological and biochemical characteristics of the isolates appear to confirm the phylogenetic grouping proposed. Cellulase activity was observed in only two strains, although all express this protein; protease activity was not found in the culture filtrate under the conditions tested. All isolates are transformable, but differ as to the efficiency and integrity of the vector. Western blot analysis revealed the presence of Ag85 complex, Mpt70 and GlnA1 and absence of reactivity for the Mpt64 and Mpt83 antigens as well as HspX. Thus, three isolates were selected to proceed with the development of a new heterologous protein expression system. The presence of some shared antigens provide new information to elucidate the relationship between NTM and BCG vaccine.

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

Dedico este trabalho à **família**: tanto a que me gerou, ensinou, cuidou e amou (meus pais, Osmar e Sueli, e meu irmão, Diego), quanto a que formarei com minha querida noiva e em breve esposa (Caroline).

*“Do SENHOR é a terra e tudo o que nela existe,
o mundo e os que nele vivem”
Rei Davi (Salmo 24:1)*

Ao meu **Deus** que de maneira tão maravilhosa teceu cada detalhe do meu corpo, da minha personalidade e das minhas emoções. Que com sua enorme bondade tem provido tudo àquilo que eu necessito. Que com muita paciência e misericórdia tem cuidado de mim. Que através de seu infinito amor me salvou, me tirando das trevas e me transportando para o reino do seu filho amado. Que através da sua imensurável graça tem se revelado a mim, principalmente através de seu filho **Jesus**, a quem hoje chamo de amigo.

Aos meus **pais, Osmar e Sueli**, muito obrigado pelo carinho, pelos sacrifícios feitos, pelas lições ensinadas, por me preparar para a vida, por me incentivar em todo o tempo e me apoiar nas minhas escolhas, por me dar o melhor de vocês. Obrigado por transformar grandes desafios em simples etapas a serem concluídas. Amo muito vocês!

Ao meu **irmão, Diego**, agradeço pelo companheirismo e amizade, por estar sempre disponível e disposto a me ajudar, por dividir comigo momentos difíceis e momentos agradáveis, por ser uma inspiração para mim em tantas coisas. Eu não poderia escolher um irmão melhor!

À minha linda **noiva** e, muito em breve, **esposa, Carol**, obrigado por me amar por ser quem sou, por escolher dividir toda a sua vida comigo, por me incentivar quando estava desanimado, por acreditar em mim quando nem eu mesmo acreditava, obrigado por me fazer muito, muito, muito feliz! Você é perfeita pra mim.

Aos meus sogros **Wellington e Geise**, obrigado por me amarem não como genro, mas como filho.

As minhas cunhadas **Priscilla**, noiva do meu irmão, e **Karine**, irmã de Carol, muito obrigado pelas conversas e companhia em diversos momentos.

Aos meus amigos e irmãos da **Praia da Luz**, Márcio e Gizeina, Raphael e Simone, Suelen, Jack Borges e Jack Alves, Verônica, Marinho, Vanessa, Adenir e Graça, Gilmar e Márcia, Rosa e Fátima. Obrigado pelas conversas, risos, bagunças, lágrimas... Vocês completam minha vida. E aos meus alunos, obrigado por me

ensinarem a ser mais paciente e a dar o melhor de mim independente das circunstâncias. Vocês são muito especiais.

Ao meu amigo **Jean**, obrigado por me ouvir e me apoiar nas minhas escolhas. Você é um exemplo de professor, pesquisador e de homem pra mim. Sou grato à Deus por ter nos aproximado.

A todos os **colegas do laboratório** por toda ajuda, incentivo, brincadeiras, broncas, ensinamentos... Vocês são demais.

A minha orientadora **Dra. Leila de Mendonça Lima**, obrigado por acreditar em mim enquanto aluno e me proporcionar a conquista deste sonho

A Plataforma de Sequenciamento PDTIS, por todas as análises.

A toda equipe da **Coleção de Bactérias da Mata Atlântica**, em especial a Dra. Ana Carolina Vicente, curadora da coleção, e a Fernanda, com quem tive um contato mais direto, muito obrigado pelas amostras dos isolados e pela assistência que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Instituto Oswaldo Cruz** pelo apoio financeiro e pela oportunidade de realizar este trabalho.

Lista de siglas e abreviaturas

°C – grau Celsius

μF - microfaraday

μg – micrograma

μL – microlitro

μm – micrômetro

Ω – ohm

2DE – eletroforese bidimensional (*2-dimensional electrophoresis*)

2DE-DIGE – eletroforese em gel diferencial bidimensional (*2-dimensional difference gel electrophoresis*)

ADC – albumina, dextrose e catalase

Ag85 – antígeno 85

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida (*acquired immune deficiency syndrome*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – Coleção de Culturas Tipo Americana (*American Type Culture Collection*)

BAAR – bacilo álcool-ácido resistente

BCG – Bacilo de Calmette e Guérin

BCG Moreau – *Mycobacterium bovis* BCG Moreau

BCG Pasteur – *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BLASTn – Standard nucleotide BLAST

CBB – coomassie brilliant blue

CBMA – Coleção de Bactérias da Mata Atlântica

cm – centímetro

CMC – carboximetilcelulose

Da – Dalton

DNA – ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*)

DO – densidade ótica

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylenediamine tetraacetic acid*)

EUA – Estados Unidos da América

FAP – Fundação Ataulpho de Paiva

FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

fbps – proteína de ligação de fibronectina (*fibronectin bindin protein*)

FC – filtrado de cultura

FDA – *Food and Drug Administration*

FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – aceleração da gravidade

h – hora

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

hsp – Proteína de choque térmico (*heat shock protein*)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICM – Instituto Chico Mendes

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IgG – imunoglobulina G

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

kb – quilobase

kDa – quilodalton

Km² – quilômetro quadrado

lacZ – gene que codifica para β-galactosidase de *E. coli*.

LAGFB – Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática

LAGMM – Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos

LB – meio de cultura Luria Bertani

LJ – meio de cultura

LT – lisado total

m – metro

M – molar

mA – miliamper

MAC – complexo *Mycobacterium avium*

MAI – *Mycobacterium avium-intracelulare*

mc²155 – *Mycobacterium smegmatis mc²155*

MCT – Ministério de Ciência e Tecnologia

mg – miligrama
min – minuto
mL – mililitro
MLSA – *multilocus sequence analysis*
mm – milímetro
mM – milimolar
MMA – Ministério do Meio Ambiente
MMP – metaloproteases de matrix
MNT – micobactérias não-tuberculosas
MOTT – micobactérias outras que não o *M. tuberculosis* (*mycobacteria other than tuberculosis*)
Mpt – proteína de *M. tuberculosis*
MS – Ministério da Saúde
MW – peso molecular (*molecular weight*)
NCBI – Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information*)
ND – não determinado
ng – nanograma
nm – nanômetro
ONU – Organização das Nações Unidas
p/v – peso/volume
PAGE – eletroforese em gel de poli(acrilamida) (polyacrylamide gel electrophoresis)
PAN – promotor isolado de *M. paratuberculosis*
PARNASO – Parque Nacional da Serra dos Órgãos
pb – pares de base
PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
pH – potencial hidrogeniônico
pmol – picomol
PVDF – fluoreto de polivinilideno (*polyvinylidene fluoride*)
qsp – quantidade suficiente para
RBMA – Reserva da Biosfera da Mata Atlântica
RD – região de diferença ou região de deleção

RNA – ácido ribonucléico (*ribonucleic acid*)
SDS – dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)
sod – superóxido dismutase
St – meio de cultura Sauton
T – Tempo
TA – temperatura ambiente (22 °C)
TBE – tris/ácido bórico/EDTA
TBS – tampão tris salino (*tris-buffered saline*)
TCA – ácido tricloroacético (*trichloroacetic acid*)
TEA - trietanolamina
TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TIB – Tecnologia Industrial Básica
TRIS – tris-hidroxi-metil-amino-metano
TSB – meio de cultura caldo triptona de soja (*tryptic soy broth*)
Tw – Tween 80
ufc – unidades formadoras de colônias
UNESCO – Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
(*United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*)
UV – ultravioleta
V – volts
v/v – volume/volume
VM – vermelho de metila
VP – Vogues-Proskauer
WB – *Western blot*
WFCC – Federação Mundial para Coleções de Culturas (*World Federation for Culture Collections*)
WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)
WWF – Fundo Mundial para a Natureza (*World Wide Fund for Nature*)

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

1.1	Classificação das micobactérias não-tuberculosas proposta por Runyon (1959)	15
1.2	Distribuição dos casos notificados de infecção por micobactérias de crescimento rápido associadas a procedimentos invasivos, segundo o estado de notificação entre 1998-2009	17
1.3	Sistemas de expressão de proteínas	23

RESULTADOS

4.1	Morfologia das colônias	41
4.2	Testes bioquímicos	43
4.3	Análise do gene <i>rrs</i>	54
4.4	Análise do gene <i>hsp65</i>	54
4.5	Cálculo da eficiência de transformação	57
4.6	<i>Western blot</i>	63

ANEXOS

8.1	Meio TSB	106
8.2	Meio de cultura 7H9 contendo Tween 80 e glicerol.	106
8.3	Solução de ADC.	106
8.4	Meio LB	106
8.5	Meio Sauton	107
8.6	Solução de fucsina fenicada	107
8.7	Solução descorante	107
8.8	Solução azul de metileno	107
8.9	Meio para teste de redução de nitrato	108

8.10	Meio Christensen	108
8.11	Meio caldo glicosado	108
8.12	Meio para teste de anaerobiose	108
8.13	Meio nutriente	108
8.14	Meio para teste de lecitinase	109
8.15	Tampão de lise bacteriana	109
8.16	Tampão de amostra de proteínas 1x	109
8.17	Géis 12 % SDS-PAGE – 7 cm	109
8.18	Tampão de corrida Laemmli 1x	109
8.19	Solução de coomassie blue R-250	110
8.20	Solução descorante	110
8.21	Tampão de amostra SB-nativo	110
8.22	Tampão TBS 10x	110
8.23	Oligonucleotídeos usados nas reações de PCR	110
8.24	Ciclagens para as reações de PCR	111
8.25	Tampão TBE 10x	111
8.26	Curva de crescimento CBMA 226 em meio LB/Tw	112
8.27	Curva de crescimento CBMA 234 em meio LB/Tw	112
8.28	Curva de crescimento CBMA 247 em meio LB/Tw	112
8.29	Curva de crescimento CBMA 271 em meio LB/Tw	113
8.30	Curva de crescimento CBMA 271 em meio St/Tw	113
8.31	Curva de crescimento CBMA 293 em meio LB/Tw	113
8.32	Curva de crescimento CBMA 294 em meio LB/Tw	113
8.33	Curva de crescimento CBMA 295 em meio LB/Tw	113

8.34	Curva de crescimento CBMA 326 em meio LB/Tw	114
8.35	Curva de crescimento CBMA 326 em meio St/Tw	114
8.36	Curva de crescimento CBMA 329 em meio LB/Tw	114
8.37	Curva de crescimento CBMA 329 em meio St/Tw	114
8.38	Atividade enzimática para celulase com amostras do lisado total	115
8.39	Atividade enzimática para celulase com amostras do filtrado de cultura	115

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

1.1	Biomass brasileiros	1
1.2	Mata Atlântica	3
1.3	Parque Nacional da Serra dos Órgãos	7
1.4	Sítio de coleta das amostras da CBMA	10
1.5	Envelope celular das micobactérias	12
1.6	Árvore filogenética das micobactérias	14

RESULTADOS

4.1	Avaliação das condições de crescimento do isolado CBMA 226 após 7 dias	36
4.2	Curvas de crescimento	38
4.3	Morfologia dos isolados da CBMA	40
4.4	Testes bioquímicos	44
4.5	Perfil temporal de secreção de proteínas	46
4.6	SDS-PAGE comparativo	47
4.7	Zimografia para avaliar atividade proteásica	48
4.8	Western blot para detectar presença de celulase	50
4.9	Zimografia em meio de cultura sólido para avaliar atividade celulase	50
4.10	Zimografia em gel de poliacrilamida para avaliar atividade celulase	51
4.11	Ensaio de atividade enzimática para avaliar atividade celulase	51
4.12	Produtos de PCR purificados	53
4.13	Árvores filogenéticas dos isolados da CBMA/IOC	55

4.14	O plasmídeo pUS989	56
4.15	Capacidade de transformação	58
4.16	Antígenos compartilhados com o complexo <i>M. tuberculosis</i> – Mpt64	60
4.17	Antígenos compartilhados com o complexo <i>M. tuberculosis</i> – Mpt70	60
4.18	Antígenos compartilhados com o complexo <i>M. tuberculosis</i> – Mpt83	61
4.19	Antígenos compartilhados com o complexo <i>M. tuberculosis</i> – HspX e GlnA1	62
4.20	Antígenos compartilhados com o complexo <i>M. tuberculosis</i> – Ag85	63

ÍNDICE

Conteúdo	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Mata Atlântica.	2
1.1.1 Características gerais	2
1.1.2 Breve histórico	4
1.1.3 Medidas de proteção	5
1.2 Parque Nacional da Serra dos Órgãos	6
1.2.1 Identificação	6
1.2.2 Importância biológica e social/econômica	7
1.2.3 Importância científica	8
1.3 Coleção de Bactérias da Mata Atlântica	9
1.4 Gênero <i>Mycobacterium</i>	11
1.4.1 Características gerais	11
1.4.2 Identificação e classificação	12
1.5 Micobactérias não tuberculosas	16
1.5.1 Aspectos clínicos	16
1.5.2 Habitat	18
1.6 Relação das MNT com a vacina brasileira contra tuberculose	19
1.6.1 A vacina contra tuberculose	19
1.6.2 Influência das MNT na resposta imune a BCG	20
1.7 Sistemas de expressão de proteínas heterólogas	22

1.7.1	Micobactérias em sistemas de expressão de proteínas	24
2.	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral.	25
2.2	Objetivos específicos.	25
3.	METODOLOGIA	26
3.1	Aquisição dos isolados micobacterianos	26
3.2	Curvas de crescimento	26
3.3	Coloração de Zielh-Neelsen	26
3.4	Testes bioquímicos	27
3.5	Obtenção de proteínas totais	28
3.6	Precipitação de proteínas	28
3.7	Dosagem de proteínas	29
3.8	Perfil de secreção de proteínas	29
3.8.1	Ao longo da curva de crescimento	29
3.8.2	Comparativo entre os isolados	29
3.9	Zimografia para detecção de proteases	30
3.10	Zimografia para detecção de celulasas	30
3.10.1	Em meio de cultura sólido	30
3.10.2	Em gel de poliacrilamida	30
3.11	Ensaio enzimático para detecção de atividade celulase	31
3.12	Western Blot	31
3.13	PCR para confirmação de identidade genética	32
3.14	Purificação dos produtos de PCR.	32
3.15	Sequenciamento	33

3.16	Análises filogenéticas	33
3.16.1	BLAST	33
3.16.2	Alinhamento de sequências	33
3.16.3	Árvore filogenética	33
3.17	Preparação de DNA plasmidial	34
3.18	Preparo de micobactérias eletrocompetentes	34
3.19	Transformação bacteriana	35
4.	RESULTADOS	36
4.1	Caracterização microbiológica	36
4.1.1	Curvas de crescimento	37
4.1.2	Morfologia	39
4.1.3	Testes bioquímicos	41
4.2	Caracterização bioquímica	45
4.2.1	Perfil de secreção de proteínas	45
4.2.2	Secreção de proteases	48
4.2.3	Produção de celulasas	49
4.3	Caracterização molecular	52
4.3.1	Identidade genética	52
4.3.2	Capacidade de transformação	55
4.4	Caracterização imunológica	59
4.4.1	Identificação de antígenos compartilhados	59
5	DISCUSSÃO	64
5.1	Aspectos microbiológicos	64
5.2	Aspectos bioquímicos	68

5.3	Desenvolvimento de um sistema de expressão de proteínas heterólogas	72
5.3.1	Capacidade de transformação	72
5.3.2	Características gerais da cepa hospedeira	74
5.4	Relação MNT e vacina BCG	75
6.	CONCLUSÕES	79
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8.	ANEXOS	106

1. Introdução

O Brasil ocupa o primeiro lugar na lista dos Países Megadiversos – grupo de 17 nações que abrigam de 60 a 80 % da biodiversidade total do planeta – devido ao número de espécies e níveis de endemismo (espécies presentes apenas ou quase somente em determinados locais) (Brandon *et al.*, 2005; Mittermeier *et al.*, 1997). Com sete biomas (quatro dos mais ricos do planeta – Mata Atlântica, Cerrado, Amazônia e Pantanal) e o maior sistema fluvial do mundo, o Brasil, indiscutivelmente, tem a mais vasta biota continental da Terra (Figura 1.1). A bacia amazônica, responsável pela maior biodiversidade terrestre e de água doce do Brasil, representa cerca de 40 % das florestas tropicais remanescentes no mundo. O Brasil também contém dois hotspots de biodiversidade (o Cerrado e a Mata Atlântica) e a maior área úmida tropical do mundo (o Pantanal) (Brandon *et al.*, 2005).

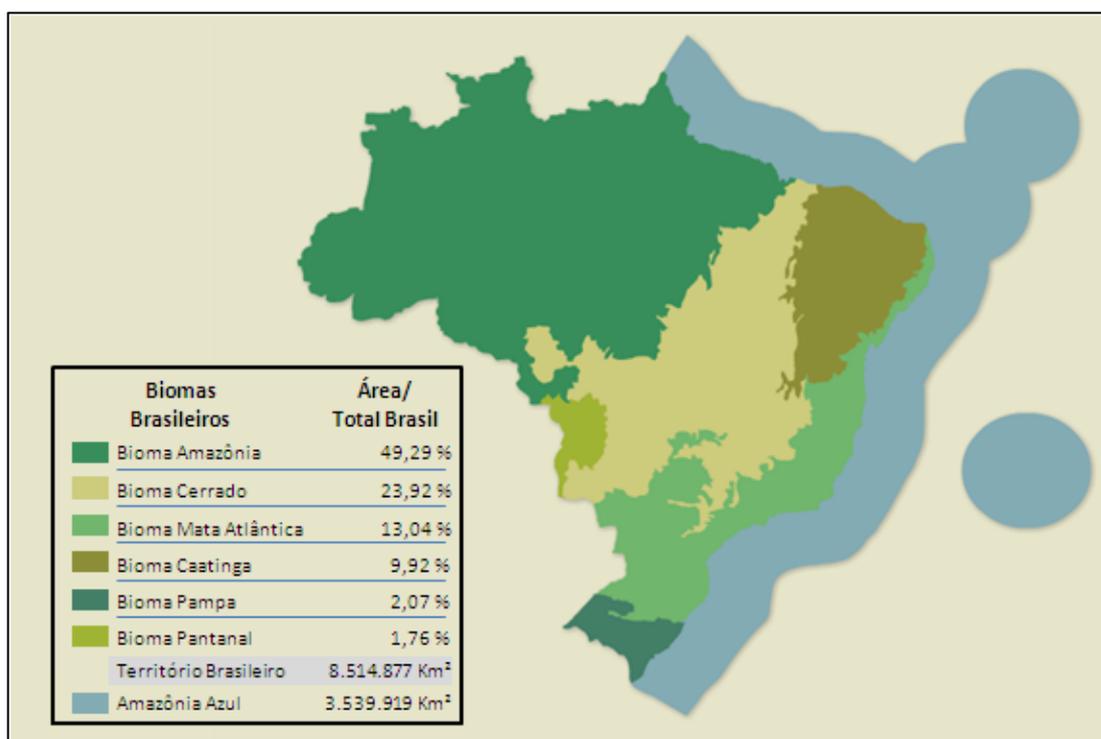


Figura 1.1: Biomas Brasileiros. Fonte: Adaptado Instituto Chico Mendes <<http://www.icmbio.gov.br/porta/biodiversidade/unidades-de-conservacao/biomas-brasileiros.html>> e Portal Brasil <<http://www.brasil.gov.br/sobre/meio-ambiente/geografia>>

Além de toda a biodiversidade terrestre abrigada em um território de aproximadamente 8,5 milhões de km² (o maior entre os países tropicais), o Brasil

tem jurisdição sobre mais de 3,5 milhões de km² de águas oceânicas. Esse território marítimo recebeu o nome de Amazônia Azul devido a sua biodiversidade, que abriga diversas espécies como corais, esponjas e peixes. Um exemplo é o arquipélago de Abrolhos (localizado no litoral sul da Bahia), que concentra a maior biodiversidade marinha do Atlântico Sul, com cerca de 1.300 espécies registradas, entre elas o coral-cérebro, só encontrado nessa região (Montenegro, 2009). A área da Amazônia Azul pode aumentar para cerca de 4,5 milhões de km² caso a Organização das Nações Unidas (ONU) aceite a proposta de extensão da plataforma continental brasileira, entregue em 17 de maio de 2004 (Torres & Ferreira, 2005).

Os dados da biodiversidade brasileira são impressionantes: 210.000 espécies conhecidas (45.000 espécies de plantas, 1.700 aves, 540 mamíferos, 850 bactérias) entre 1,8 milhões de espécies esperadas (inclui aquelas que ainda não foram descritas ou registradas) em todo o planeta, representando mais de 13% da biota mundial (Lewinsohn & Prado, 2005). No entanto, 657 espécies da fauna nacional e 495 da flora encontram-se extintas ou ameaçadas de extinção, um aumento de cerca de 200% e 360%, respectivamente, nos últimos 10 anos (IBGE, 2002 e 2012). Segundo o “Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção” (MMA, 2008), as principais ameaças às espécies e aos biomas brasileiros são: a destruição do habitat; o desmatamento; as queimadas; a exploração madeireira; a conversão de campos em pastagens; a construção de represas; a poluição de rios e oceanos; a chegada de espécies invasoras; a caça; a pesca predatória; e o tráfico e comércio de animais e plantas silvestres. Nesse contexto, a Mata Atlântica destaca-se por apresentar o maior número de espécies da flora e da fauna ameaçadas de extinção (275 e 269, respectivamente) (IBGE 2012).

1.1. Mata Atlântica

1.1.1. Características gerais

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta ombrófila densa do continente americano, que originalmente estendia-se de forma contínua ao longo da costa brasileira, penetrando até o leste do Paraguai e nordeste da Argentina em sua porção sul. No passado cobria mais de 1,5 milhões de km², com 92 % desta área no

Brasil, mas conta atualmente com menos de 100.000 Km² (Figura 1.2) (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2001; Galindo-Leal & Câmara, 2003). A Mata Atlântica é um dos 25 hotspots mundiais de biodiversidade, abrigando 8.000 espécies endêmicas de plantas vasculares e 567 de vertebrados (Myers *et al.*, 2000).

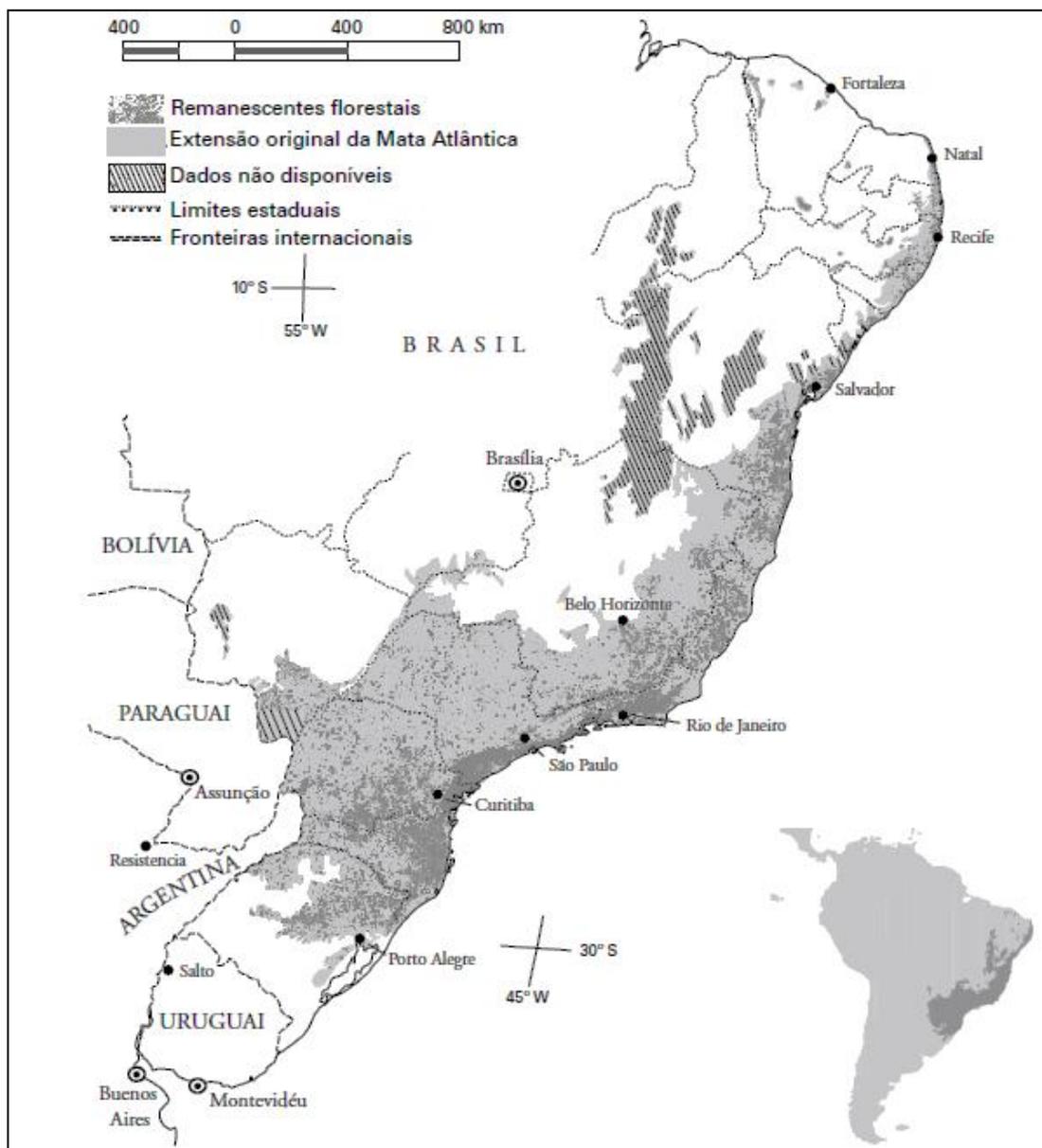


Figura 1.2: Mata Atlântica. Extensão original e atual da Mata Atlântica. Fonte: Galindo-Leal & Câmara, 2003

Embora seja extremamente heterogênea, pois se estende em uma ampla faixa latitudinal (4° a 32° S) e longitudinal (35° a 60° W) com diferentes zonas climáticas, altitude (nível do mar a 2.900 m), tipo e profundidade dos solos, temperatura média do ar, pluviosidade (4.000 mm a 1.000 mm/ano), a Mata

Atlântica mantém certa homogeneidade florística (Mantovani, 2003; Oliveira-Filho & Fontes, 2000; Barbosa & Thomas, 2002). Assim, diversos ecossistemas compõem esse bioma: Florestas Úmidas de Araucárias, Florestas Costeira da Bahia, Florestas do Interior da Bahia, Brejos de Altitude do Nordeste, Cerrados de Campos Rupestres, Florestas Úmidas do Alto Paraná, Florestas Costeiras de Pernambuco, Florestas do Interior de Pernambuco, Florestas Costeiras da Serra do Mar. Paralelamente à riqueza vegetal, a fauna é o que mais impressiona na região. A maior parte das espécies de animais brasileiros ameaçados de extinção é originária da Mata Atlântica, como os micos-leões, a lontra, a onça-pintada, o tatu-canastra e a arara-azul-pequena. Além desta lista, também vivem na região gambás, tamanduás, preguiças, antas, veados, cotias, quatis e muito outros (WWF-Brasil).

1.1.2. Breve histórico da

A destruição da Mata Atlântica vem ocorrendo desde o século XVI com a chegada dos europeus à costa brasileira. Inicialmente, devido à exploração em larga escala do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), seguido por áreas para ocupação, agricultura e defesa contra ataques indígenas, além do uso da madeira para os diversos fins, inclusive como combustível. O desmatamento intensificou-se nos séculos seguintes: criação extensiva de gado no Nordeste (XVI ao XVIII), cana-de-açúcar de São Paulo ao Rio Grande do Sul (XVIII), mineração em São Paulo, Minas Gerais e Goiás (XVIII), ciclo do café no Sudeste e no Paraná (XIX ao XX), industrialização e acelerado crescimento demográfico (XX) (Coimbra-Filho e Câmara, 1996; Galindo-Leal & Câmara, 2003; Câmara, 2005).

Da década de 1970 a 2000, a derrubada de florestas foi especialmente severa devido ao uso de etanol como combustível, a expansão da indústria de celulose e papel e manutenção da exploração predatória. Em 15 anos, 11.650 km² de florestas foram perdidos, equivalente a 284 km² por dia (Fundação SOS Mata Atlântica *et al.*, 1998). No século XXI, houve redução significativa do desmatamento em diversos estados, no entanto, a situação continua grave, sobretudo nos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul – estados que mais desmataram entre 2008 e 2010, devido, principalmente, a atuação de empresas siderúrgicas que exploram carvão vegetal (Rangel, 2010).

Atualmente, há apenas 7,9 % de remanescentes em áreas acima de 100 hectares em comparação ao que havia originalmente. Considerando todos os fragmentos de floresta acima de três hectares, há 11,4 % de cobertura florestal nativa (SOS Mata Atlântica & INPE, 2010). Tal realidade impulsionou uma série de medidas para a preservação da Mata Atlântica.

1.1.3. Medidas de proteção

As primeiras medidas para a proteção da Mata Atlântica foram tomadas durante o período colonial. Na Carta Régia de Portugal de 1797, a Coroa determinou que fossem tomadas “todas as precauções para a conservação das mattas no estado do Brazil e evitar que ellas se arruinem e destruam” – aparentemente sem nenhum resultado concreto (Galindo-Leal & Câmara, 2003). No entanto, o marco foi a criação da primeira área natural protegida no Brasil – Parque Estadual da Cidade (atualmente, Parque Estadual Alberto Löfgren), em 1898 no estado de São Paulo com 1,74 km². Quase 30 anos depois foi criado o Parque Nacional do Itatiaia (1937), com 119 km². A partir desse evento, a proteção de áreas ambientais acelerou-se, sendo elas consideradas uma das mais importantes ferramentas para a preservação da biodiversidade. Outro passo importante foi o reconhecimento da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica (RBMA) pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO), em 1991-2002, sendo a primeira unidade da Rede Mundial de Reservas da Biosfera brasileira e a maior em área florestada do planeta, com cerca de 350.000 km², abrangendo áreas de 15 dos 17 estados brasileiros onde ocorre a Mata Atlântica (RBMA, 1996).

No âmbito legal, o Código Florestal, adotado em 1965, foi o pioneiro ao restringir a exploração da mata de araucária e determinar a preservação de parte das áreas das propriedades das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste do país. A primeira menção específica à Mata Atlântica na legislação brasileira surgiu na Constituição Federal de 1988, que se refere ao bioma como patrimônio nacional (Galindo-Leal & Câmara, 2003).

Atualmente, a preservação da Mata Atlântica ocorre devido as Unidades de Conservação estabelecidas pelo Sistema Nacional de Unidades de Conservação. Elas dividem-se em dois grupos: 1) Unidades de Proteção Integral, que são

dedicadas exclusivamente à preservação do ambiente natural, sendo proibida a presença de populações permanentes e vedadas as atividades econômicas, e 2) Unidades de Uso Sustentável, onde é permitida a permanência das populações tradicionais, sendo mantidas e incentivadas, bem como são permitidas as atividades econômicas de baixo impacto ambiental, essencialmente de subsistência. Em 2011 a Mata Atlântica apresenta mais de 36.000 km² de áreas protegidas: 10.587 km² de proteção integral e 25.497 km² de uso sustentável (IBGE, 2012). Neste cenário, destaca-se o Parque Nacional da Serra dos Órgãos: criado em 30 de novembro de 1939 – terceiro parque nacional mais antigo do país, representando um importante marco na história das Unidades de Conservação Brasileira.

1.2. Parque Nacional Serra dos Órgãos

1.2.1. Breve histórico

O Parque Nacional Serra dos Órgãos (PARNASO) é uma Unidade de Conservação Federal de Proteção Integral, subordinada ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Criado em 30 de novembro de 1939, no governo Getúlio Vargas, pelo Decreto-Lei nº 1822, o PARNASO é o terceiro parque mais antigo do país (Itatiaia em 1937 e Iguaçu em janeiro de 1939), representando um importante marco na história das Unidades de Conservação Brasileira. Inicialmente, com uma área de aproximada de 90 Km², o PARNASO teve sua área ampliada, através do Decreto nº 90.023, de 2 de agosto de 1984, para 105 km². Foi novamente ampliado em 13 de setembro de 2008 para 200 km², com a incorporação da antiga Reserva Ecológica do Alcobaça (Figura 1.3) (<http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos>).

A Serra dos Órgãos é apontada pelo Ministério do Meio Ambiente como uma das cinco áreas de extrema relevância para conservação na Mata Atlântica ocupa posição central no Corredor da Serra do Mar e está inserida na Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, decretada pela UNESCO. Além disso, é importante ressaltar que o PARNASO está inserido em quatro municípios (Magé, Petrópolis, Teresópolis e Guapimirim), cuja população total é de cerca de 700 mil habitantes e sofre grande pressão da urbanização (<http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos>).

1.2.2. Importância biológica e social/econômica

O clima no Parque é tropical superúmido (com 80 a 90 % de umidade relativa do ar), com média anual que varia de 13 °C a 23 °C (atingindo valores de 38 °C a -5 °C, nas partes mais altas) e variação pluviométrica de 1.700 a 3.600 mm. Por estar localizado na Serra do Mar, apresenta relevo bastante acidentado com grande variação de altitude (de 80 m a 2.263 m na Pedra do Sino, ponto culminante do Parque) e, apresentando pelo menos cinco tipos de solos e diversas associações entre eles. Os mananciais que drenam para as duas principais bacias hidrográficas fluminenses, a do Paraíba do Sul e a da Baía de Guanabara, estão situados no Parque. O PARNASO apresenta quatro fisionomias vegetais distintas (floresta submontana, montana, altomontana e campos de altitude) com cerca de 2.800 espécies, entre elas 369 de orquídeas e mais de 100 de bromélias. Este Parque abriga cerca de 750 espécies de vertebrados (20 % do total de espécies deste grupo no Brasil) e mais de 500 de invertebrados, contendo 120 animais ameaçados de extinção. É a região com maior riqueza de aves endêmicas da mata atlântica (142 espécies) (<http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos>).

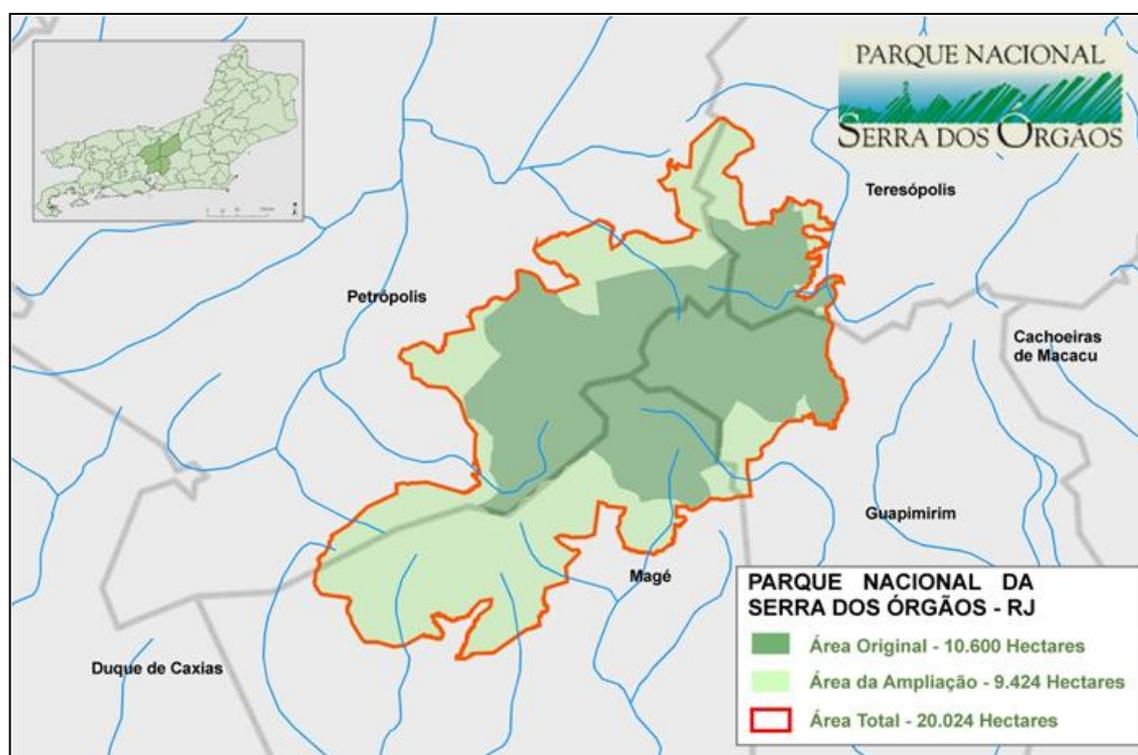


Figura 1.3: Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Localização e ampliação. Fonte: Ministério do Meio Ambiente <http://www.mma.gov.br/img/ascom/fotos/serradosorgaos_mapa.jpg>

A região é um importante pólo turístico e atrai milhares de veranistas todos os anos. É um dos melhores locais do país para a prática de esportes de montanha, como escalada, caminhada, rapel e outros; além de ter fantásticas cachoeiras (Véu de Noiva, Petrópolis, com 42 m de queda). O Parque tem a maior rede de trilhas do Brasil – mais de 130 km de trilhas em todos os níveis de dificuldade. Entre as escaladas destacam-se o Dedo de Deus, considerado o marco inicial da escalada no país, e a Agulha do Diabo, escolhida uma das 15 melhores escaladas em rocha do mundo (<http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos>).

1.2.3. Importância Científica

O PARNASO é a unidade de conservação federal com o maior número de pesquisas autorizadas no país, segundo o Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade. Em 2012 foram autorizados 91 projetos de pesquisa a serem realizados no PARNASO, um aumento de 5 % em relação a 2011. A alta biodiversidade da região atrai pesquisas básicas de zoologia, botânica, biologia, taxonomia, sistemática, filogenética, ecologia e tantas outras, que buscam compreender a relação das espécies umas com as outras e com o meio físico. As atividades turísticas desenvolvidas no parque trazem a demanda por pesquisas na área de turismo, impactos em trilhas e planejamento. A relação do parque com sua área de entorno e as comunidades humanas que ali vivem é outra lacuna de conhecimento que pode ser explorada por pesquisas em ciências sociais, geografia e planejamento urbano e ambiental. Além destes, existem muitos outros campos de pesquisa que podem ser explorados no Parque Nacional da Serra dos Órgãos e região (<http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos>; MMA, 2007).

A sua proximidade à cidade do Rio de Janeiro (90 km), fácil acesso, boa infraestrutura de apoio à pesquisa, possibilidade de acesso ao banco de dados de gestão do conhecimento científico produzido no Parque e dados climáticos obtidos em sua rede de estações meteorológicas, são alguns dos atrativos para o desenvolvimento de pesquisas no PARNASO. Outro atrativo é o Centro de Referência em Biodiversidade da Serra dos Órgãos, que conta com laboratório, herbário, sala de aula, laboratório de geoprocessamento e biblioteca, e está disponível para os pesquisadores e também para turmas em visita didática. Além

disso, dispõe da Casa do Pesquisador (capacidade para oito pessoas), do alojamento (grupos de até 28 pessoas), do Abrigo Quatro (próximo a Pedra do Sino) e do Abrigo do Açú, que apoiam pesquisas nos campos de altitude e outras áreas remotas, e das áreas de camping da Sede Guapimirim, Sede Teresópolis, Pedra do Sino e Pedra do Açú, que também podem ser usadas como ponto de apoio por pesquisadores (<http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos>; MMA, 2007).

Dentre os diversos projetos de pesquisa aprovados que incluem essa região, destaca-se o projeto “Biodiversidade da Mata Atlântica do Rio de Janeiro” (2007), iniciativa da FAPERJ/FINEP e FIOCRUZ, que culminou na criação da “Coleção de Bactérias da Mata Atlântica”.

1.3. Coleção de Bactérias da Mata Atlântica

A Coleção de Bactérias da Mata Atlântica (CBMA) foi criada em 2007, como resultado dos projetos “Biodiversidade da Mata Atlântica do Rio de Janeiro” (2007) e “Implantação e Estruturação do Centro de Recursos Biológicos em Saúde e Ambiente da Fundação Oswaldo Cruz” (2007), financiado pela FINEP (Carta-Convite MCT/FINEP/Ação Transversal – TIB – Centros de Recursos Biológicos). Em 2010 recebeu mais recursos para sua expansão através do projeto “Taxonomia e expansão da Coleção de Bactérias da Mata Atlântica, Rio de Janeiro”, aprovado pela FAPERJ (http://www.faperj.br/interna.phtml?obj_id=6886). A CBMA é filiada à *World Federation for Culture Collections* (WFCC, Federação Mundial para Coleções de Culturas) sob o registro WDCM958 (<http://cbma.fiocruz.br/index>)

Está situada no Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos (LAGMM) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – FIOCRUZ, sob a curadoria da pesquisadora Dra. Ana Carolina Paulo Vicente. Tem como finalidade a aquisição, isolamento, preservação, identificação, catalogação e distribuição de bactérias cultiváveis do solo da Mata Atlântica, devidamente autenticados, para dar suporte à pesquisa científica, estudos epidemiológicos, bem como ao desenvolvimento e produção de bioprodutos para diagnóstico, vacina e medicamentos, atuando também como provedores de serviços especializados. Entre os serviços prestados pela CBMA está o fornecimento de culturas a instituições públicas (pesquisa, serviços, ensino ou indústria), a manutenção e preservação de culturas e a

caracterização taxonômica (gene ribossomal 16S rRNA, *Multi Locus Sequence Analysis* (MLSA) e outras técnicas moleculares ou bioquímicas) (<http://cbma.fiocruz.br/index>; Bruce *et al.*, 2010).

As bactérias depositadas na CBMA foram isoladas de diferentes amostras de solo extraídas ao longo de nove sítios de coleta, sendo retirado a cobertura vegetal. Os tipos de solo avaliados foram bonfim amarelo, bonfim vermelho, ajax (traço preto arenoso), torto (Vale das Antas) campo úmido e cavalinho, sendo típicos, representativos e abundantes da Mata Atlântica (Figura 1.4). A identificação dos primeiros 100 isolados definiu a presença dos seguintes gêneros de bactérias: *Acinetobacter*, *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Cupriavidus*, *Dyella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Leifsonia*, *Mycobacterium*, *Paracoccus*, *Paenibacillus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Silvimonas*, *Streptomyces* e *Variovorax* (<http://cbma.fiocruz.br/index>; Bruce *et al.*, 2010).

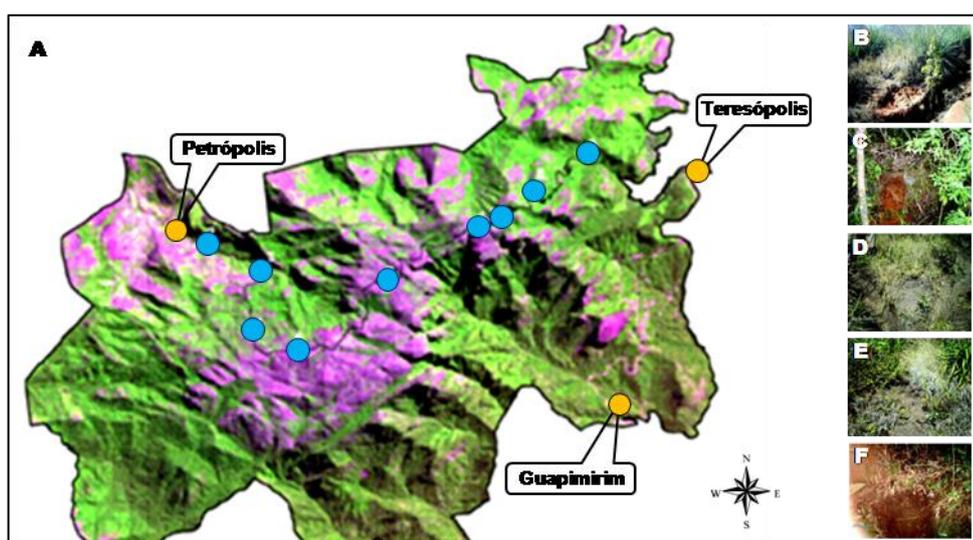


Figura 1.4: Sítios de coleta das amostras da CBMA. (A) Mapa topográfico do PARNASO com as sedes marcadas em amarelo e os sítios de coleta azul, (B-F) tipos de solo da Mata Atlântica: (B) Bonfim amarelo, (C) Bonfim vermelho, (D) Ajax, (E) Torto e (F) Campo úmido. Fonte: Adaptado de Bruce *et al.*, 2010 e do site da CBMA <<http://cbma.fiocruz.br/index>>.

Entre eles destacamos o gênero *Mycobacterium*, cujas espécies têm sido identificadas desde o isolamento de *M. leprae* em 1873 (Rastogi *et al.*, 2001). É um gênero altamente diverso, abriga desde espécies saprófitas não patogênicas de vida livre (como *M. smegmatis*) até patógenos intracelulares obrigatórios, como *M. tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose, que ocupa o segundo lugar no ranking mundial de doenças infectocontagiosas, perdendo apenas para a síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (Ventura *et al.*, 2007; WHO, 2012).

1.4. Gênero *Mycobacterium*

1.4.1. Características gerais

O gênero *Mycobacterium* compreende, até o momento, 163 espécies e 13 subespécies registradas, das quais aproximadamente 40% foram descritas desde o ano 2000 (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>). Taxonomicamente é o único gênero dentro da família *Mycobacteriaceae*, pertencente à subordem *Corynebacterineae* da ordem dos *Actinomycetales* (Willians & Wilkins, 1986). Caracteriza-se principalmente por apresentar um distinto envelope celular constituído por três segmentos e composto por 30 a 40 % em massa de ácidos micólicos (Figura 1.5) (Kaur *et al.*, 2009; Niederweis *et al.*, 2010). Além disso, este gênero apresenta um elevado conteúdo de guanina e citosina (G+C) no genoma (entre 60 e 70 %, com exceção para *Mycobacterium leprae*, 58 %), é composto por bactérias microaerófilas, imóveis (sem flagelo) e não capsuladas (Ventura *et al.* 2007; Sousa *et al.*, 2000). Apresenta em sua maioria morfologia bacilar ou coco bacilar ou, raramente, filamentosa; onde os bacilos são pequenos, finos, retos ou ligeiramente encurvados, apresentando-se isolados, aos pares ou em pequenos aglomerados (Sousa *et al.*, 2000). Embora, classicamente caracterizadas como não formadoras de esporos (Tortora, 2005), Ghosh e colaboradores (2009) descreveram essa capacidade após estudo com *M. marinum* e *M. bovis* cepa Bacillus Calmette-Guérin (BCG). As micobactérias são estruturalmente relacionadas às bactérias Gram positivas, mas não são consideradas como tal, devido à peculiaridade da sua parede celular rica em lipídeos, que frequentemente não retém cristal violeta e não aparecem após coloração de Gram (Barrera, 2007). São caracterizadas como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), pois resistem à ação desses elementos químicos (Daffé & Draper, 1998).

Assim, a definição do gênero *Mycobacterium* assenta sobre três critérios: 1) estrutura de ácidos micólicos no envelope celular, 2) a álcool-ácido resistência dos bacilos e 3) elevado conteúdo G+C no genoma (Rastogi *et al.*, 2001).

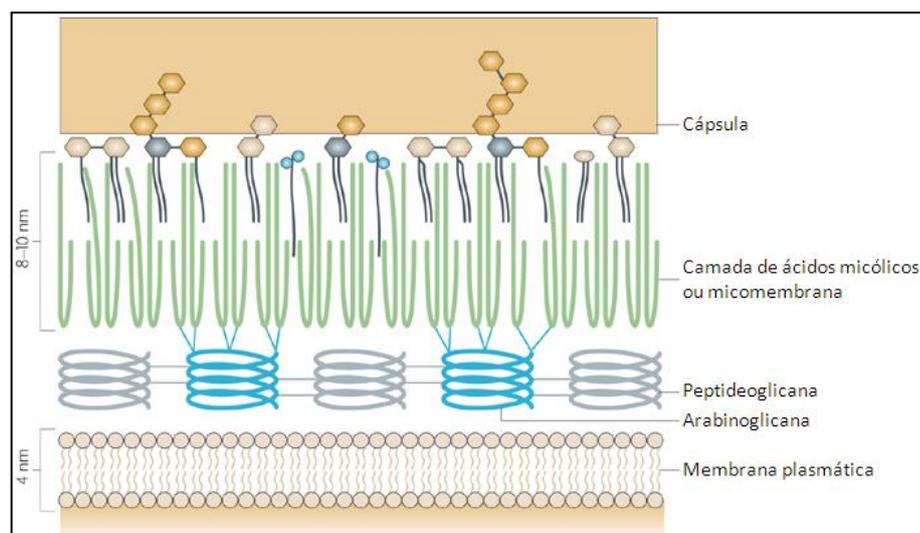


Figura 1.5: Envelope celular das micobactérias. A parede celular é composta principalmente por três estruturas covalentemente ligadas, peptidoglicana (cinza), arabinoglicana (azul) e ácidos micólicos (verde), conferindo hidrofobicidade e baixa fluidez. Diversos lipídeos livres se ligam a micomembrana, intercalando com os ácidos micólicos. A cápsula é composta principalmente de polissacarídeos como glucano e arabinomanano. Fonte: Adaptado de Abdallah *et al.*, 2007.

1.4.2. Identificação e classificação

Desde 1880 até o final da década de 1980, os estudos taxonômicos em micobactérias foram realizados baseados unicamente em aspectos fenotípicos, como álcool-ácido resistência, tempo e condições de crescimento (temperatura, meio de cultura), aspectos da colônia (pigmentação e rugosidade), morfologia microscópica, resistência a antibióticos e testes bioquímicos (Sabater *et al.*, 1978; Sompolinsky *et al.*, 1979; Rogal *et al.*, 1990; Ausina *et al.*, 1992; Wayne & Sramek, 1992; Tortoli, 2003).

A partir da década de 1990, o foco dos estudos taxonômicos foi redirecionado para aspectos genotípicos, por terem uma maior precisão e serem mais rápidos, tendo como alvo regiões altamente conservadas do genoma que contém sequências hipervariáveis nas quais deleções, inserções ou substituições de nucleotídeos seriam específicas para cada espécie (Rogal *et al.*, 1990; Dobner *et al.*, 1996; Tortoli, 2003). Os principais genes escolhidos para essa tarefa foram: 16S rRNA (*rrs*), que codifica a molécula de RNA ribossomal da subunidade pequena (16S) do ribossomo procariótico; *hsp65*, codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa; *sodA*, codifica a superóxido dismutase; *recA*, codifica parte do sistema de recombinação e reparo do DNA; *rpoB*, codifica a subunidade β da RNA polimerase ;

e *ITS*, codifica o espaçador interno entre as subunidades ribossomais 16S e 23S (Tortoli, 2003; Adékambi & Drancourt, 2004; Tortoli, 2006). Essa nova metodologia para identificação de micobactérias resultou em um aumento exponencial no número de novas espécies descritas nos últimos 20 anos (Adékambi & Drancourt, 2004; Tortoli, 2006; Dai *et al.*, 2011B)

O gene *rrs* possui aproximadamente 1.500 pares de base e é o gene mais amplamente usado para análises filogenéticas em bactérias, principalmente por estar presente em quase todas as bactérias, por manter sua função ao longo do tempo, sugerindo que as variações no DNA sejam indicativas de evolução, e por ser grande o suficiente para análises de bioinformática. No entanto o uso deste gene tem suas limitações. Estudos sugerem que, após sequenciamento do gene *rrs* para isolados desconhecidos, é possível identificar o gênero em mais de 90 % do casos, porém a identificação de espécie varia entre 65 e 83 % e cerca de 1 a 14 % dos isolados permanecem sem identificação. Essas dificuldades ocorrem devido ao reconhecimento de novas taxa, pouca informação em banco de dados, alta (ou mesmo total) similaridade com a sequência de outras espécies ou mesmo sequências variadas identificadas como a mesma espécie ou complexo (Tortoli, 2003; Janda & Abbott, 2007). Nas micobactérias, o gene *rrs* apresenta duas regiões principais (posições 130 a 210 e 430 a 500 do gene de *Escherichia coli*) compartilhadas por todas as espécies, mas também hipervariáveis, sendo específicas para cada espécie. De maneira geral, as espécies de crescimento lento apresentam apenas uma cópia deste gene, enquanto que as de crescimento rápido (exceto *M. chelonae* e *M. abscessus*) apresentam duas. Além disso, não existe um número mínimo de nucleotídeos diferentes para propor uma nova espécie em micobactérias: espécies diferentes podem apresentar poucas bases diferentes ou, diante de claras diferenças fenotípicas, não diferir em base alguma. Em contrapartida, é possível também que uma mesma espécie apresente diferenças de até sete pares de base (Tortoli, 2003).

O gene *hsp65*, composto por aproximadamente 1.600 pares de bases (Shinnick, 1987), tem sido proposto para identificação de micobactérias em nível de espécie desde a década de 1990 (Telenti *et al.*, 1993). É mais conservado que os demais *loci* utilizados para identificação, exceto o gene *rrs*, mas também não é capaz de diferenciar os membros do complexo *M. tuberculosis* (com exceção do *M.*

Assim, diversas classificações foram propostas para as micobactérias nos últimos 60 anos baseadas em diferentes características como genótipo, tempo de crescimento, patogenicidade, origem, relação agente-hospedeiro, habitat (Runyon 1959; Davidson, 1989; Tortoli, 2003). No entanto, a classificação mais aceita atualmente foi a proposta por Runyon (1959) que separa as micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* das demais e divide as não pertencentes a este complexo em quatro grupos baseado no tempo de crescimento e produção de pigmentos carotenóides (Tabela 1.1): fotocromógenas (crescimento lento e produzem pigmento quando expostas a luz), escotocromógenas (crescimento lento e produzem pigmento independente da luz), acromógenas (crescimento lento e não produzem pigmento) e de crescimento rápido (produtoras ou não de pigmento) (Tortoli, 2003).

Tabela 1.1: Classificação das micobactérias não-tuberculosas proposta por Runyon.

Grupos	Pigmentação	Tempo de crescimento*	Exemplos
Grupo I	Fotocromógenas	Lento	<i>M. marinum</i> e <i>M. kansasii</i> .
Grupo II	Escotocromógenas	Lento	<i>M. scrofulaceum</i> e <i>M. xenopi</i>
Grupo III	Acromógenas	Lento	<i>M. bovis</i> e complexo <i>M. avium</i>
Grupo IV	Produtoras ou não de pigmento	Rápido	<i>M. fortuitum</i> e <i>M. smegmatis</i>

(*) Considera-se micobactérias de crescimento rápido as espécies que formam colônias visíveis em meio de cultura sólido em até 7 dias.

As micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* são estritamente patogênicas, de crescimento lento e, antes de desencadearem a doença no homem, encontram-se dissipadas no meio ambiente (Tortoli, 2006). Estes microorganismos possuem 99,9 % de similaridade em relação à sequência de nucleotídeos e apresentam sequências idênticas do gene *rrs*, diferindo entre si em aspectos fenotípicos e patogenicidade (Boddinghaus *et al.*, 1990; Sreevatsan *et al.*, 1997).

As micobactérias que não pertencem ao complexo *M. tuberculosis* nem a *M. leprae* são denominadas como micobactérias não-tuberculosas (MNT), micobactérias outras que não o *M. tuberculosis* (“MOTT” – *mycobacteria other than tuberculosis*), micobactérias ambientais ou micobactérias atípicas (Runyon, 1959; Covert, 1999; Falkinham III, 2002; Primm *et al.*, 2004; Gopinath & Singh, 2010).

1.5. Micobactérias não-tuberculosas

1.5.1. Aspectos clínicos

As MNT foram consideradas saprófitas e de pouca relevância até as décadas de 1950 e 1960, porém, quando trabalhos que as relacionavam a diferentes patologias começaram a ser publicados, esse paradigma começou a mudar (Covert *et al.* 1999). No entanto, o estudo sobre as MNT avançou, de fato, a partir de 1979, quando Wolinsky defendeu convincentemente a hipótese das MNT serem capazes de causar doenças e o Hospital Nacional Judaico patrocinou uma conferência em Denver (Colorado, EUA), estimulando diversos estudos na área (Davidson, 1981; Falkinham III, 1996). Atualmente, sabe-se que as MNT são patógenos importantes de humanos, mamíferos, aves e peixes e têm impactado significativamente as taxas de morbidade e mortalidade em humanos, além de causar impactos econômicos na agricultura (Primm *et al.*, 2004; Falkinham III, 2009).

Infecções pulmonares, de pele e tecidos moles, linfáticas, nos ossos e articulações, no trato gastrointestinal, alergias, são alguns exemplos de doenças causadas pelas MNT, ocorrendo principalmente em idosos, crianças e indivíduos submetidos a cirurgias (Falkinham III, 1996; Primm *et al.*, 2004; Tortoli, 2009). Ainda hoje, a incidência de doenças relacionadas às MNT parece estar aumentando; o Canadá, por exemplo, registrou um aumento de 1,5 para 9,0 casos por 100 mil habitantes durante 1997-2003 (Marras *et al.*, 2007; Falkinham III, 2011). Infecções disseminadas ocorrem, na grande maioria dos casos, em indivíduos com AIDS, via trato gastrointestinal ou respiratório, principalmente através de espécies do complexo *M. avium* (MAC), onde houve um aumento exponencial no número de casos desde o primeiro em 1982 (Zakowski *et al.*, 1982; Tortoli, 2009). De 25 a 50 % dos pacientes com o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) dos EUA e Europa encontram-se infectados por MNT sendo esta considerada a segunda principal causa de morte desses pacientes (Falkinham III, 1996; Covert *et al.*, 1999). Antes da epidemia de AIDS, e ainda hoje em indivíduos imunocompetentes, a doença por MNT foi principalmente pulmonar; mas, em contraste, em pacientes imunodeficientes, as infecções por MNT são geralmente disseminadas, dificultando seu tratamento (Falkinham III, 1996; Viehman *et al.*, 2013).

No Brasil, há registros de casos de infecção por diversas espécies de MNT espalhados por todo o território nacional, desde a década de 1990. A maioria delas manifestou-se na forma de infecções pulmonares, tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes com HIV. (Ferreira *et al.*, 2002; Pasqualotto *et al.*, 2003; Matos *et al.*, 2004; Zimarioli *et al.*, 2008; Motta e Bona *et al.*, 2011; Senna *et al.*, 2011) Além desses casos, foram registrados alguns surtos de infecções por MNT causados por procedimentos cirúrgicos invasivos, tais como biópsias, laparoscopia, cirurgia artroscópica, cirurgia plástica, intervenções cosméticas entre outros, que espalharam-se por 22 (mais o Distrito Federal) dos 26 estados brasileiros, contabilizando 2.520 casos. Embora já houvesse registros de casos desde 1998, a grande maioria ocorreu entre 2004 e 2008 (Tabela 1.2), principalmente nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Pará, São Paulo e Paraná. As principais espécies identificadas nesses casos foram *M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. bolletti*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* (Leão *et al.*, 2009; ANVISA, 2010).

Tabela 1.2: Distribuição dos casos notificados de infecção por micobactérias de crescimento rápido associadas a procedimentos invasivos, segundo o estado de notificação entre 1998-2009. ANVISA, 2011.

Estado	Nº de casos	Percentual (%)
RJ	1.107	43,90
ES	363	14,40
PA	327	13,00
SP	193	7,65
PR	149	5,90
RS	115	4,55
GO	95	3,80
MT	50	2,00
DF	33	1,30
MG	31	1,24
PI	11	0,44
BA	11	0,44
CE	9	0,34
SC	6	0,24
SE	5	0,20
PE	5	0,20
AL	3	0,12
TO	2	0,08
RR	1	0,04
RN	1	0,04
PB	1	0,04
AM	1	0,04
AC	1	0,04
Total	2.520	100,00

A grande maioria das MNT são patógenos oportunistas e podem estar envolvidas em algum tipo de infecção em humanos, por isso diversas espécies foram isoladas de pacientes com doenças causadas por elas (Tortoli, 2003 e 2006; Falkinham III, 2009). No entanto, é amplamente aceito que as pessoas infectadas pelas MNT tenham sido contaminadas através do ambiente, visto que não há registro de transmissão pessoa-pessoa nos últimos 30 anos (Wolinsky 1979; Falkinham III, 2009). Assim, seus habitats originais, têm sido descobertos, verificando a sobreposição destes com os habitats humanos, o que explica o crescente número de infecções por MNT (Falkinham III, 2009).

1.5.2. Habitat

Entre esses habitats temos: reservatórios naturais de água, sistemas de distribuição de água potável, encanamentos domésticos, hospitalares e de outras construções, estações de tratamento de água e de esgoto, banheiras de hidromassagem e spas, piscinas públicas, máquinas de gelo, aerossóis (poeiras ou gotículas) naturais, domésticos e de outras construções, diferentes tipos de solos, águas de pântanos, águas ácidas, poluentes ambientais (como hidrocarbonetos), edifícios danificados pela água, fluidos para remoção de partículas metálicas, água e solo de fazendas de gado, alimentos, animais silvestres e domésticos, insetos, protozoários (Primm *et al.*, 2004; Norby *et al.*, 2007; Falkinham III, 2009; Torvinen *et al.*, 2010). As MNT encontram-se, também, globalmente distribuídas, sendo encontradas em todos os continentes, inclusive na Antártida (Kriss *et al.*, 1976; Chang *et al.*, 2002; Martín-Casabona *et al.*, 2004; Primm *et al.*, 2004; Chilima *et al.*, 2006; Buijtels *et al.*, 2009; Torvinen *et al.*, 2010; Shojaei *et al.*, 2011; Imperiale *et al.*, 2012; Learn-Han *et al.*, 2012; Thomson *et al.*, 2013).

Essa diversidade de habitats é resultado, principalmente: 1) do seu envelope celular rico em ácidos micólicos, que confere as MNT hidrofobicidade favorecendo a resistência a antibióticos, aderência a superfícies, formação de biofilmes; 2) sua baixa taxa de síntese de proteínas e uma taxa metabólica normal, que determina seu lento crescimento (até mesmo para as de crescimento rápido), permitindo uma melhor adaptação às variações nas condições ambientais; 3) sua resistência a

diferentes tipos de estresse (variações de pH, nutrientes, temperatura, oxigênio), que permite sua sobrevivência em diversos ambientes antrópicos e naturais.

No Brasil, há poucos registros descrevendo habitats para as MNT. Falcão e colaboradores (1993) verificaram que as MNT foram os únicos organismos potencialmente patogênicos encontrados em amostras de água tratada e de nascentes. Restrepo e colaboradores (2009) verificaram a presença de *M. mucogenicum* nas águas das torneiras do centro cirúrgico, indicando que a água do ambiente hospitalar seja a mais provável fonte de contaminação para os casos dos surtos pós-cirúrgicos. Outro habitat indicado como possível fonte de infecção foi o leite puro de búfala; onde foram identificadas cinco espécies de MNT, sendo três delas caracterizadas como patógenos oportunistas (Jordão Júnior *et al.*, 2009). E, recentemente, micobactérias também foram isoladas de amostras de solo do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (Bruce *et al.*, 2010), como dito anteriormente, indicando possíveis novas fontes de contato com as MNT.

1.6. Relação das MNT com a vacina brasileira contra tuberculose

1.6.1. A vacina contra a tuberculose

O Bacilo de Calmette e Guérin (BCG) foi uma das primeiras vacinas a ser desenvolvida e é a única disponível até o momento contra a tuberculose (Doherty & Andersen, 2005). Esta cepa foi originada da cepa virulenta do *M. bovis* isolada do leite de uma vaca com mastite tuberculosa por Edmond Nocard em 1901, que foi atenuada por Albert Calmette e Camille Guérin após 230 passagens *in vitro* ao longo de 13 anos (1908 – 1921) no Instituto Pasteur, França (Liu *et al.*, 2009). Após diversos testes em diferentes modelos animais, ficou estabelecido a segurança e eficácia da vacina BCG. Assim, a partir de 1924, as culturas de BCG foram distribuídas para laboratórios ao redor do mundo – mais de 60 países nos primeiros 4 anos (Oettinger *et al.*, 1999). A cepa de BCG chegou ao Brasil em 1925, após o médico uruguaio Dr. Julio Moreau entregar a amostra ao pesquisador Arlindo de Assis, que a denominou BCG Moreau. A partir de então a vacina passou a ser produzida e estudada no Instituto Vital Brazil e, posteriormente (1930), na Fundação Atauilpho de Paiva (FAP) (Benevolo-de-Andrade *et al.*, 2005). A FAP é atualmente a

única a produzir a vacina BCG no Brasil, fabricando cerca de 15 milhões de doses ao ano, atendendo a 100 % da demanda nacional (<http://www.bcgfap.com.br/web/>).

Após quase um século desde o seu desenvolvimento, a eficácia da vacina continua sendo amplamente discutida. Ela garante uma boa proteção (eficácia maior que 80 %) contra formas graves da tuberculose em crianças, principalmente a meningoencefalite tuberculosa e tuberculose miliar, além de proteger também contra a hanseníase e contra outras infecções por MNT. No entanto, a eficiência contra a tuberculose pulmonar em adolescentes e adultos é reduzida, variando entre 80 e 0 %, com média em 50 % (Colditz *et al.*, 1995; Brewer, 2000; Trunz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Merle *et al.*, 2010; Ottenhoff & Kaufmann, 2012). Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar a variação na eficácia da vacina contra a tuberculose: diferenças entre as cepas vacinais BCG, diferentes cepas clínicas de *M. tuberculosis*, variabilidade genética e nutricional da população, redução da memória imunológica em adolescentes, co-infecção com helmintos, associação com a AIDS, diferenças metodológicas entre os estudos e a exposição às MNT (Liu *et al.*, 2009; Ottenhoff & Kaufmann, 2012).

A influência das MNT na vacinação com BCG e na tuberculose tem sido discutida desde a década de 1960 (Palmer & Long, 1966). No entanto, na última década, essa questão tem ganhado maior relevância devido ao grande aumento no número de espécies identificadas.

1.6.2. Influência das MNT na resposta imune a BCG

Estudos *in vivo*, em diferentes modelos animais e diferentes espécies de MNT, demonstram que infecções com MNT contribuem positivamente para a resposta imune contra a tuberculose. No entanto há divergências quanto ao grau de proteção oferecido pelas MNT comparado a vacina BCG (Palmer & Long, 1966; Collins, 1971; Edwards *et al.*, 1982; Brown *et al.*, 1985; Orme *et al.*, 1986; Kamala *et al.*, 1996). Edwards e colaboradores (1982), em estudo com *M. avium-intracelulare* (MAI) e cobaias, verificaram que MAI e BCG protegem igualmente bem contra cepas de *M. tuberculosis* de baixa virulência. Em contra partida, Kamala e colaboradores (1996), após estudo também em cobaias, verificaram que a proteção contra *M. tuberculosis* pode variar entre 24 e 90 % em relação a BCG, dependendo da espécie

utilizada e de sua origem. Resultados similares foram observados em camundongos (Orme *et al.*, 1986)

Embora o contato com MNT auxilie na resposta imune contra *M. tuberculosis*, diversos estudos demonstram que o prévio contato com MNT reduz a capacidade protetora da vacina BCG (Weiszfeiler & Karasseva, 1981; Brandt *et al.*, 2002; Flaherty *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2007). Brandt e colaboradores (2002), após estudo com diferentes espécies, adquiridas de diversas fontes e utilizando camundongos como modelo animal, demonstraram que o contato com MNT antes da vacinação com BCG pode levar ao bloqueio da multiplicação do BCG e, conseqüentemente, ao bloqueio da proteção contra tuberculose. Flaherty e colaboradores (2006) verificaram que exposição a MNT após a vacinação com BCG aumenta o risco de infecção por *M. tuberculosis*, após estudo com camundongos e *M. avium*.

Assim, tem sido proposto que a exposição à MNT pode mascarar o efeito protetor da vacina BCG; ou causar um efeito protetor cruzado, devido a antígenos compartilhados entre BCG e MNT; ou ainda causar um efeito antagonista, devido à presença de antígenos no BCG, mas não nas MNT (Palmer & Long, 1966; Brandt *et al.*, 2002; Checkley *et al.*, 2011). Além disso, as variações metodológicas entre os diversos estudos nessa área deixam claro a peculiaridade de cada região e a necessidade de estudos mais específicos (Checkley *et al.*, 2011).

Nesse contexto, uma melhor caracterização das micobactérias encontradas na Mata Atlântica, além de proporcionar um maior conhecimento sobre a biodiversidade nacional, contribuiria grandemente para o entendimento das relações entre MNT nacionais e a cepa vacinal brasileira, BCG Moreau. Adicionalmente, seria possível também propor alguma utilização biotecnológica, como o desenvolvimento de vacinas mais eficazes, métodos de diagnóstico diferenciais entre tuberculose e infecções por MNT e desenvolvimento de um novo sistema de expressão de proteínas heterólogas, visto que micobactérias secretam uma grande diversidade de proteínas e são capazes de fazer modificações pós-traducionais.

1.7. Sistemas de expressão de proteínas heterólogas

Sistemas de expressão heterólogos têm contribuído grandemente para análises estruturais e funcionais de proteínas e suas aplicações, produção de proteínas, enzimas e fármacos para fins médicos e industriais, melhoramento genético animal e vegetal, terapia gênica, entre outros. São geralmente empregados para a produção elevada de proteínas cujo isolamento a partir de seus produtores originais é difícil devido ao seu baixo teor (Gellissen, 2005). São proteínas heterólogas aquelas produzidas em organismos diferentes daqueles de sua origem.

Diversos sistemas têm sido desenvolvidos utilizando diferentes organismos, desde procariotos simples a eucariotos complexos. A Tabela 1.3 relaciona 11 sistemas de expressão de proteínas comumente utilizados e suas principais características (Gellissen, 2005). Além destes existem outros sistemas usados em escalas menores, como o utilizado em outras bactérias (Miyake *et al.*, 2007; D'Urzo *et al.*, 2013), leveduras (Kawai *et al.*, 2010) e células de insetos (Smith *et al.*, 1983; Aumiller *et al.*, 2012). Apesar dessa grande diversidade de sistemas de expressão, existem proteínas cuja expressão ainda é difícil devida à baixa estabilidade, toxicidade para o hospedeiro, formação de corpos de inclusão, carência de modificações pós-traducionais, elevados custos e complexidade do processo (Miyake *et al.*, 2007).

E. coli é um dos hospedeiros mais utilizados para a produção de proteínas heterólogas por ser bem caracterizado geneticamente, simples de manusear e crescimento rápido e barato em cultura (Arya *et al.*, 2008). Diversas modificações têm sido desenvolvidas de modo a melhorar a expressão neste sistema, tais como o uso de novas cepas (Sahdev *et al.*, 2008), novos vetores (Hunt, 2005), novos promotores (Baneyx, 1999) e ligação de proteínas que facilitem a purificação da proteína recombinante (Terpe, 2002). No entanto, diversos genes permanecem incapazes de serem expressos nesse sistema ou apresentam graves desvantagens como a não realização de modificações pós-traducionais, a expressão em corpos de inclusão e o uso de códons muito diferentes daqueles usados em proteínas eucarióticas (Jonasson *et al.*, 2002; Arya *et al.*, 2008).

Assim, novos sistemas continuam a ser desenvolvidos visando minimizar estas limitações e aprimorar a eficiência, entre eles alguns que utilizam micobactérias como hospedeiro.

Tabela 1.3: Sistemas de expressão de proteínas. Parâmetros chaves para escolha de um sistema de expressão adequado (Gellissen, 2005).

Sistema de Expressão	Classificação	Etapas de desenvolvimento	Pontes dissulfeto	Glicosilação	Secreção	Custos da fermentação	Uso de antibióticos	Custos de segurança	Escala do processo	Produtos no mercado
<i>Escherichia coli</i>	Bactéria Gram-negativa	Finalizado	(Sim); no periplasma	Não	Secreção periplasmática	De baixo a moderado, dependente de promotor	Sim	Baixo	Industrial	Sim
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bactéria Gram-negativa	Finalizado	(Sim); no periplasma	Não	Secreção periplasmática	De baixo a moderado, dependente de promotor	Não	Baixo	Piloto	Não
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Bactéria Gram-positiva	Finalizado	Limitado	Não	Possível	Baixo	Sim	Baixo	Piloto	Não
<i>Hansenula polymorpha</i>	Levedura metilotrófica	Finalizado	Sim	Sim; exceto terminal α 1, 3 manose	Possível	Baixo	Não	Baixo	Laboratorial	Sim
<i>Pichia pastoris</i>	Levedura metilotrófica	Finalizado	Sim	Sim; exceto terminal α 1, 3 manose	Possível	Baixo	Não	Baixo	Industrial	Sim
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Levedura dimórfica	Estágios recentes	Sim	Sim; característic. desconhec.	Possível	Baixo	Não	Baixo	Laboratorial	Não
<i>Arxula adenivorans</i>	Levedura dimórfica	Estágios recentes	Sim	Sim; característic. desconhec.	Possível	Baixo	Não	Baixo	Laboratorial	Não
<i>Aspergillus sojae</i>	Fungo filamentosos	Finalizado	Sim	Sim; característic. desconhec.	Possível	Baixo	Não	Baixo	Piloto	Não
<i>Sordaria macrospora</i>	Fungo filamentosos	Estágios recentes	Sim	Sim; característic. desconhec.	Possível	Baixo	Não	Baixo	Laboratorial	Não
Células vegetais	Eucarioto superior	Finalizado	Sim	Sim; terminal fucose	Possível; restrições de tamanho	Moderado	Não	Baixo	Piloto	Não
Células de mamíferos	Eucarioto superior	Finalizado	Sim	Sim; semelhante a humana	Possível	Alto	Não	Alto	Industrial	Sim

1.7.1. Micobactérias em sistemas de expressão de proteínas

Sistemas de expressão de proteínas em micobactérias são interessantes, pois elas são capazes de fazer modificações pós-traducionais, contribuindo para uma proteína recombinante mais parecida com a original. *M. smegmatis* foi o primeiro e tem sido o hospedeiro mais comum entre as micobactérias (Snapper *et al.*, 1990; Delogu *et al.*, 2004; Gutierrez-Lugo *et al.*, 2006; Goldstone *et al.*, 2008). Isolada no final do século XIX, não patogênica, de crescimento rápido, com tempo de duplicação de aproximadamente três horas, e genoma seqüenciado, tem sido usada como modelo em diversos estudos micobacterianos (Alvarez & Tavel, 1885; Goldstone *et al.*, 2008; He & Buck, 2010). Seu uso como hospedeiro é principalmente para expressar proteínas de *M. tuberculosis*, pois, além do crescimento rápido, fornece chaperonas específicas das micobactérias que poderiam ajudar a corrigir a estrutura tridimensional das proteínas recombinantes (Goldstone *et al.*, 2008; Noens *et al.*, 2011).

Após *M. smegmatis*, outras micobactérias tem sido usadas para o desenvolvimento de novos sistemas de expressão, como *M. aurum* e *M. vaccae*. (Medeiros *et al.*, 2002; Parish & Brown, 2008). *M. aurum* tem sido usado principalmente em estudos de sensibilidade e resistência a antibióticos usados no tratamento de tuberculose e hanseníase (Lazraq *et al.*, 1991). *M. vaccae*, na expressão de diversas proteínas, como superóxido dismutase e lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis* (Garbe *et al.*, 1994; Abou-Zeid *et al.*, 1997).

Assim, acredita-se ser possível o desenvolvimento de um sistema de expressão totalmente nacional – utilizando-se uma micobactéria nacional, isolada da Mata Atlântica (PARNASO), como hospedeiro – para expressão de proteínas heterólogas e não apenas de micobactérias. Sua construção seria de modo que a proteína expressa fosse secretada, contribuindo para uma proteína recombinante mais facilmente purificada e mais parecida com a nativa. Este novo sistema de expressão de proteínas heterólogas seria uma importante ferramenta biotecnológica com possíveis impactos em áreas como saúde e economia, contribuindo para o avanço nas pesquisas em diversas doenças e para o desenvolvimento de produtos inovadores.

2. Objetivos

Objetivo geral

Caracterizar espécies de micobactérias não-tuberculosas isoladas da Mata Atlântica visando aspectos úteis para a seleção de uma espécie de interesse para o desenvolvimento de um novo sistema de expressão de proteínas heterólogas totalmente nacional e, adicionalmente, fornecer subsídios importantes para elucidar a relação dessas micobactérias com a vacina BCG.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar aspectos microbiológicos como perfil de crescimento e morfologia;
- ✓ Analisar o perfil de proteínas de cada isolado por SDS-PAGE;
- ✓ Verificar atividade enzimática por zimografia;
- ✓ Verificar a identidade genética dos isolados através da PCR de alvos selecionados e posterior sequenciamento de DNA
- ✓ Verificar a presença de possíveis proteínas compartilhadas com o complexo *M. tuberculosis* por western blotting
- ✓ Avaliar a capacidade de transformação por plasmídeos

3. Metodologia

Os materiais usados estão descritos no Anexo I

3.1. Aquisição dos isolados micobacterianos

19 isolados do gênero *Mycobacterium* foram fornecidos em meio TSB (Anexo I, Tabela 8.1) pela Coleção de Bactérias da Mata Atlântica (CBMA/IOC – FIOCRUZ). A cepa *Mycobacterium smegmatis* mc²155 (mc²155), adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC), foi reativada do nitrogênio líquido (acervo do laboratório – LAGFB) em meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco™) contendo Tween 80 (Sigma) e glicerol (Sigma) (Anexo I, Tabela 8.2), suplementado com 10 % ADC (Anexo I, Tabela 8.3), durante 5 dias à 37 °C sob agitação. A partir dessas, novas culturas foram realizadas em meio LB (Anexo I, Tabela 8.4) contendo Tween 80 a 0,05 % (LB/Tw) que deram origem aos lotes sementes, contendo 1 mL de cultura em 15 % glicerol (Sigma), estocado à -70 °C.

3.2. Curvas de crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas em triplicatas biológicas. Culturas provenientes de lotes-semente foram reativadas em meio LB/Tw e, em seguida, cultivadas em erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de mesmo meio. Três isolados e mc²155 foram cultivados em meio Sauton (Anexo I, Tabela 8.5) contendo 0,05 % de Tween 80 (St/Tw). O acompanhamento do crescimento bacteriano foi realizado através de leituras da densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}) no espectrofotômetro Ultrospec 1100 pro (Amershan Biosystem), com início aproximado igual a 0,1. Isolados da CBMA foram crescidos sob agitação à temperatura ambiente (TA, 22 °C) e mc²155, sob agitação a 37 °C.

3.3. Coloração de Ziehl-Neelsen

Realizada de acordo com o Manual de Bacteriologia da Tuberculose (MS, 2005). Esfregaço preparado a partir de 5 µL de cultura, fixado ao fogo, coberto com

a solução de fucsina fenicada (Anexo I, Tabela 8.6), aquecido até a emissão de vapores (sem ferver) por três vezes ao longo de 5 minutos. Retirado o corante, o material foi descorado com solução álcool-ácido (Anexo I, Tabela 8.7) por 2 minutos, lavado em água corrente e corado com solução de azul de metileno (Anexo I, Tabela 8.8) por 30 segundos, seguido de lavagem em água corrente, secagem ao ar e observação em microscópio óptico.

3.4. Testes bioquímicos

Os inóculos para os testes bioquímicos vieram de culturas em lote semente crescidas em LB/Tw em fase estacionária. Todas as provas foram incubadas a TA e reveladas após 14 dias, exceto mc²155, crescido a 37 °C e revelado após 7 dias (redução do nitrato revelado após 14 dias).

Redução de nitrato: Isolados crescidos em tubo de ensaio com meio próprio (Anexo I, Tabela 8.9) a partir de inóculo de 200 µL e revelados pela adição de 400 µL de ácido sulfanílico e 400 µL de α-naftilamina.

Citrato: Isolados crescidos em tubo de ensaio contendo meio de Christensen (Anexo I, Tabela 8.10), solidificados de modo inclinado, a partir do estriamento de uma alça bacteriológica e revelados pela observação da coloração do meio.

Vermelho de metila (VM): Em isolados crescidos em tubo de ensaio contendo meio caldo glicosado (Anexo I, Tabela 8.11) é verificado o valor do pH pela adição de 0,5 mL de indicador de pH vermelho de metila.

Voges-Proskauer (VP): Isolados crescidos em tubo de ensaio contendo meio caldo glicosado a partir de inóculo de 200 µL e revelados pela adição de 1 mL de NaOH 40 % e 0,5 mg de creatina, seguido por agitação e incubação por 15 minutos a TA.

Anaerobiose: Isolados crescidos em tubo de ensaio contendo meio sólido próprio (Anexo I, Tabela 8.12) a partir de inóculo em linha reta até 2/3 do tubo de pela técnica de punctura (agulha) e revelados pela observação de crescimento no meio.

Hidrólise de gelatina: Isolados crescidos em tubo de ensaio em meio nutriente (Anexo I, Tabela 8.13) com 12 % de gelatina bacteriológica (Difco). A partir de inóculo de 200 µL e revelados por 4 horas a 4 °C.

Sabouraud: Isolados crescidos em tubo de ensaio contendo meio de Sabouraud, solidificado de modo inclinado, a partir de inóculo de uma alça bacteriológica por estriamento e revelados pela observação de crescimento no meio.

Tolerância a NaCl: Isolados crescidos em tubo de ensaio contendo meio nutriente com concentrações de NaCl de 5 %, 7 % ou 10 % a partir de inóculo de 200 µL e revelados pela observação de crescimento no meio nutriente contendo por um período de até 5 dias.

Hidrólise do amido: Isolados crescidos em placa de Petri contendo meio nutriente com 1,5 % ágar e 0,02 % amido a partir de inóculo de 10 µL e revelados com solução de iodo.

Lecitinase: Isolados crescidos em placas de Petri com contendo meio próprio (Anexo I, Tabela 8.14) a partir de inóculo de 10 µL.

3.5. Obtenção de proteínas

Para obtenção das proteínas totais, o sedimento bacteriano equivalente a 9 mL de cultura foi ressuspenso em 1,0 mL de tampão de lise (Anexo I, Tabela 8.15) com 1 % Triton X-100 e incubado por 30 minutos no gelo. As células foram lisadas por lise mecânica com 4 ciclos de 1 minuto em velocidade média e 4 ciclos de 15 segundos em velocidade rápida, com 1 minuto de repouso no gelo entre eles, no equipamento Bead Beater (Biospec Products INC.). As proteínas secretadas foram obtidas a partir do sobrenadante de cultura, centrifugadas a 16.000 xg por 10 minutos e filtradas em membrana de PVDF 0,22 µm (Millex, Millipore). Lisado total (LT) e filtrado de cultura (FC) foram armazenados a -20 °C.

3.6. Precipitação de proteínas

Proteínas do FC foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético (TCA) na concentração final de 17 % v/v em microtubos de 2,0 mL contendo 1,6 mL de amostra, seguida de incubação a -20 °C por 10 minutos e centrifugação do material por 10 minutos a 16.000 xg. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 200 µL de acetona gelada contendo 1 % trietanolamina (TEA). Após nova

centrifugação por 5 minutos a 16.000 xg, o sobrenadante foi descartado e o sedimento final foi armazenado a -20 °C.

3.7. Dosagem de proteína

A concentração das amostras protéicas, tanto do FC quanto do LT, foi determinada através do kit RCDC (BioRad) segundo as especificações do fabricante. Este método é uma adaptação do protocolo de Lowry (1951), que é compatível tanto com agentes redutores (RC) quanto detergentes (DC).

3.8. Perfil de secreção de proteínas

3.8.1. Ao longo da curva de crescimento

Amostras de 1,6 mL do FC foram retiradas a cada 24 horas ao longo da realização curva de crescimento. Em seguida, as proteínas foram precipitadas com TCA, ressuspensas em 20 µL de tampão de amostra de proteínas 1x (Anexo I, Tabela 8.16) e aquecidas a 100 °C por 5 minutos. Metade do volume das amostras (10 µL) foram submetidas à eletroforese em géis 12 % SDS-PAGE de 7 cm e espessura de 0,75 mm (Anexo I, Tabela 8.17) em tampão de corrida Laemmli (Anexo I, Tabela 8.18) a 200 volts. Ao final os géis foram corados em solução de coomassie blue R250 (CBB-R250, Anexo I, Tabela 8.19) e descorados com solução descorante (Anexo I, Tabela 8.20).

3.8.2. Comparativo entre diferentes isolados

Amostras contendo o equivalente a 20 µg de proteínas do FC e do LT foram resolvidas em géis 12 % SDS-PAGE de 7 cm, de modo similar ao realizado ao longo da curva.

3.9. Zimografia para detecção de proteases

A produção de proteases foi avaliada tanto no FC como no LT através de zimografia em gel de poliacrilamida, utilizando-se como substrato gelatina de porco (Sigma) na concentração 0,1 %. Foram aplicados 20 µg de proteínas misturadas em tampão de amostra SB-nativo (Anexo I, Tabela 8.21) e submetidas à eletroforese em géis 12 % SDS-PAGE, de 7 cm e espessura de 0,75 mm em tampão de corrida Laemmli a 200 volts. Após corrida, o gel foi lavado duas vezes por 15 minutos em solução de Triton X-100 2,5 %, seguido por 15 minutos em H₂O Milli-Q e incubado em tampão acetato de sódio 50 mM em diferentes temperaturas (TA, 28 °C e 37 °C), pH (5,0 e 7,0) e tempo (24 h e 72 h). Ao final, foi corado em solução de CBB-R250 e descorado com solução descorante.

3.10. Zimografia para detecção de celulases

3.10.1. Em meio de cultura sólido

Cinco microlitros de cultura bacteriana (em fase estacionária) em meio LB foram adicionados em placa de petri contendo meio LB/Agar (meio LB acrescido de 1,5 % (p/v) bacto-ágar (Difco)) acrescido de 0,2 % carboximetilcelulose (CMC) (Sigma) e incubados a temperatura ambiente. Após 7 dias a placa foi corada com solução aquosa de vermelho do Congo 0,1 % por 15 minutos e descorada com solução de NaCl 1 M.

3.10.2. Em gel de poliacrilamida

A produção de celulase foi avaliada tanto em amostras do FC como do LT através de zimografia em gel de poliacrilamida, utilizando-se 0,2 % CMC como substrato. Foram aplicados 20 µg de proteínas misturadas em tampão de amostra SB-nativo e submetidas à eletroforese em géis 12 % SDS-PAGE, de 7 cm e espessura de 0,75 mm em tampão de corrida Laemmli a 200 volts.. Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes por 15 minutos em solução de Triton X-100 2,5 %, seguido por 15 minutos em H₂O Milli-Q, incubado em tampão acetato de sódio 50 mM em

diferentes temperaturas (TA, 28 °C e 37 °C), pH (5,0 e 7,0) e tempo (24 h e 72 h) e corado com vermelho do Congo como descrito anteriormente.

3.11. Ensaio enzimático para celulase

Para verificar a cinética enzimática da celulase, foi utilizado o método de BCA (ácido bicinconínico): método colorimétrico que mede a formação de grupos terminais reduzidos a partir do uso deste composto (Vlasenko *et al.*, 1998). O substrato utilizado foi 0,50 % (p/v) de CMC e 100 µg de amostra, incubado a 30 °C em tampão de acetato de sódio 50 mM. Foi avaliado a cada hora ao longo de 4 h para amostras do LT e medição única após 22 h para amostras do FC. Após esse período a amostra foi transferida para placa de 96 poços, a reação foi parada por aquecimento a 95 °C por 5 min, seguido por adição dos Reagentes I e II do kit BCA Protein Assay – Reducing Agent Compatible (Thermo Scientific), segundo orientação do fabricante, e leitura a 550 nm no espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices).

3.12. Western Blot

Proteínas resolvidas em géis 12 % SDS-PAGE, de 7 cm e espessura de 1 mm foram eletro-transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C, GE) em equipamento Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad), a 15 V durante 50 minutos, segundo especificações do fabricante. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (Sigma) para visualização e verificação da qualidade da transferência. Após ser descorada, seguiu-se com bloqueio em leite Mólico (Nestlé) 10% (p/v)/TBS (Anexo I, Tabela 8.22) por uma noite a 4 °C.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBS 1x contendo 0,1% Tween 20 (3 vezes por 5 minutos), seguido por incubação durante 2 horas com agitação suave com diferentes anticorpos primários (anticorpos e diluição especificados em Resultados, item 4.4.1) em leite Mólico 5 % (p/v)/TBS. A membrana foi lavada sequencialmente com TBS/Tw (3 vezes por 5 minutos) e TBS 1x (3 vezes por 5 minutos) e então incubada por 1 hora na presença do anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Pierce) em leite Mólico 5 % (p/v)/TBS e novamente lavada

como descrito acima. Para revelar as membranas utilizamos o Kit Super Signal® (Pierce) conforme as instruções do fabricante, onde o produto da reação enzimática foi detectado por quimioluminescência, através de exposição em filme (Thermo Scientific), seguido por incubação por 2 minutos em solução de revelação (Kodak), lavagem em água e 3 minutos em solução de fixação (Kodak), na ausência de luz.

3.13. PCR para confirmação da identidade genética

As reações de PCR foram realizadas no equipamento Mastercycler gradiente (Eppendorf), com volume final de 25 µL, utilizando 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega), 200 ng de cada iniciador específico (*Forward* e *Reverse*) e 1 µL de uma diluição 1:10 do LT do isolado bacteriano. Para amplificação do gene *rrs*, foram utilizados os iniciadores PA (*forward*) e PH (*reverso*) (Bruce *et al.*, 1992) e para o gene *hsp65*, os iniciadores Tb11 (*forward*) e Tb12 (*reverso*) (Talenti *et al.*, 1993) (Anexo I, Tabela 8.23). As ciclagens utilizadas para ambas as reações estão especificadas no Anexo I, Tabela 8.24.

Os produtos das reações de PCR foram posteriormente analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % a 80 v, em TBE 0,5X (Anexo I, Tabela 8.25), aplicando-se 10% do volume final das amostras misturados em tampão de amostras de DNA 6X (Promega). Após a corrida, o DNA foi corado com brometo de etídeo, descorado em água destilada e visualizado sob luz ultravioleta (UV) em transiluminador; as imagens dos géis foram digitalizadas em equipamento GelDoc (BioRad).

3.14. Purificação do produto de PCR

Os fragmentos de PCR resultantes correspondentes aos genes *rrs* e *hsp65* foram purificados através da utilização do kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) segundo recomendações do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram posteriormente analisados em gel de agarose conforme descrito acima.

3.15. Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger na Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ. As amostras foram entregues com volume ajustado para 7,5 µL contendo iniciador na concentração de 3,2 pmols e 1 µL do produto de PCR purificado.

3.16. Análises filogenéticas

3.16.1. BLAST

As sequências obtidas da Plataforma de Sequenciamento foram conferidas uma a uma e foi montada uma sequência consenso com base no sequenciamento da mesma amostra e mesmo iniciador em dois momentos distintos. Foi utilizada a ferramenta nucleotide blast e algoritmo Megablast do programa on line BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do NCBI, utilizando o banco de dados “16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archea)” para análise das sequências do gene *rrs*. Os fragmentos do gene *hsp65* foram analisados contra um servidor do BLASTn contendo o banco de dados desse locus do gene *hsp65* desenvolvido por Dai *et al.* (2011B), composto por 149 espécies e subespécies de micobactérias (<http://msis.mycobacteria.info>). Para questões de comparação, essas análises foram realizadas também com *M. bovis* BCG Pasteur (BCG Pasteur).

3.16.2. Alinhamento de sequências

As sequências consenso foram alinhadas entre si utilizando o programa ClustalW2 on line (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), selecionando, como tipo de sequência, “DNA” e usando o padrão nos demais parâmetros.

3.16.3. Árvore filogenética

A partir dos dados de alinhamento foram inferidas árvores filogenéticas utilizando o programa MEGA 5.10. Foi utilizado o método da máxima

verossimilhança, Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) com distribuição uniforme como modelo de substituição de nucleotídeos, e valores de bootstrap para 1.000 replicatas.

3.17. Preparação de DNA plasmidial

Para avaliar a capacidade de transformação dos isolados micobacterianos, foi utilizado o vetor pUS 989 (Medeiros *et al.*, 2002), contendo uma origem de replicação para micobactérias e outra para *E. coli*, resistência a canamicina e o gene da beta-galactosidase de *E. coli* sob controle de um promotor micobacteriano constitutivo (*PAN*).

Após o crescimento da cepa de *E. coli* DH5 α , portadora deste vetor, em meio LB contendo canamicina (25 $\mu\text{g/mL}$) foi realizada a minipreparação de DNA plasmidial com o kit Wizard Plus SV Minipreps – DNA purification system (Promega), segundo recomendações do fabricante, seguido por visualização em gel de agarose 1 %, em TBE 0,5 X. A quantificação do DNA plasmidial foi realizada usando o kit QubitTM dsDNA BR (Life Technologies), segundo especificações do fabricante, e fazendo a leitura no equipamento Qubit^{2.0} (Life Technologies).

3.18. Preparo de micobactérias eletrocompetentes

As micobactérias eletrocompetentes foram preparadas a partir de cultura em fase exponencial de crescimento. Após 90 minutos no gelo, a cultura foi centrifugada a 4.000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com solução aquosa de 10 % glicerol estéril e gelado em um volume igual a 25 % do original. Repetiu-se a centrifugação e nova lavagem com 10 % glicerol com 5 % do volume original. Centrifugou-se uma última vez e o sedimento foi ressuspenso em 1 % do volume original da cultura. A suspensão bacteriana foi aliquoteada em microtubos com 200 μL e armazenada a -70 °C.

3.19. Transformação bacteriana

Após adição de 1 µg de DNA plasmidial às micobactérias eletrocompetentes, foi realizada a transformação por eletroporação no equipamento Gene Pulser (BIO-RAD) nas seguintes condições: 2,5 kV; 25 µF; 200 Ω. Em seguida, o material foi transferido para tubo Falcon de 50 mL com 5 mL de meio LB e incubado por 2 horas sob agitação (isolados da CBMA a temperatura ambiente e mc²155 a 37 °C). Os transformantes foram selecionados em meio LB/agar contendo canamicina (25 µg/mL) e X-Gal (5 g/100 mL).

4. Resultados

A Coleção de Bactérias da Mata Atlântica possui atualmente em seu acervo mais de 800 isolados bacterianos, entre eles, 19 classificados como micobactérias, porém sem identificação em nível de espécie. Foi realizado um crescimento inicial em meio LB/Tw sob agitação a temperatura ambiente com alguns dos isolados. Os nove isolados que cresceram melhor foram selecionados para este estudo: CBMA 226, 234, 247, 271, 293, 294, 295, 326 e 329.

4.1. Caracterização microbiológica

Para verificar a melhor condição de crescimento dos isolados recebidos da CBMA/IOC, o isolado CBMA 226 foi submetido a diferentes condições de crescimento, conforme figura 4.1. O cultivo foi realizado em replicatas biológicas em erlenmeyer de 50 mL com 10 mL de meio de cultura LB – meio rico e genérico, amplamente utilizado em estudos de biologia molecular – contendo 0,05 % de Tween 80, de modo a minimizar a formação de grumos. O resultado foi avaliado após sete dias de crescimento através da leitura da DO_{600nm} .

Verificou-se (1) bom crescimento a 25 °C e ausência de crescimento a 37 °C, (2) que a agitação favorece o crescimento a TA e (3) que a luz não interfere no crescimento desse isolado. Em crescimento sem agitação, observa-se formação de agregados bacterianos no fundo do recipiente. Assim, os isolados da CBMA foram cultivados a TA, sob agitação e na presença de luz.

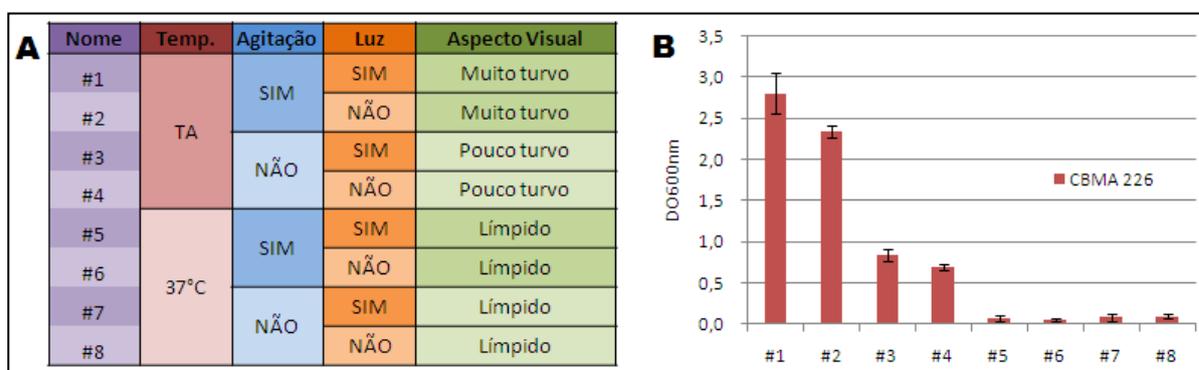


Figura 4.1: Avaliação das condições de crescimento do isolado CBMA 226 após 7 dias. (A) Condições de crescimento e aspecto visual após 7 dias. (B) Gráfico representando a média e o desvio padrão de 2 experimentos independentes.

4.1.1. Curvas de crescimento

Para verificar a cinética de crescimento bacteriano, foram realizados alguns testes iniciais com os meios LB/Tw e Sauton (meio definido livre de proteínas – usado para produção da vacina BCG) contendo 0,05 % Tween 80 (St/Tw), com os isolados CBMA 271, 326 e 329 e mc²155. Ao contrário de mc²155, que cresceu bem em St/Tw, observou-se a preferência dos isolados pelo meio LB/Tw, pois apresentaram um maior crescimento (aumento de 2 a 3 vezes na DO_{600nm}) e entraram mais rapidamente na fase log. Assim, as curvas de crescimento bacteriano dos isolados foram realizadas em meio LB/Tw (Figura 4.2; Anexo II, item 8.8. Curvas de crescimento). A pureza das culturas foi verificada periodicamente por coloração de Zielh-Neelsen, específica para micobactérias, e observação em microscópio de luz, garantindo que não houve contaminação.

O isolado CBMA 226 (Figura 4.2 A) apresentou um comportamento atípico em relação aos demais. Durante as primeiras 100 h houve um leve decréscimo na DO_{600nm} e apresentou crescimento após cerca de 150 h, atingindo a DO_{600nm} máxima por volta de 170 h de crescimento, voltando a decrescer nas próximas 70 h e estabilizando nas últimas 30 h avaliadas. Não houve formação de grumos durante a curva.

Foram encontradas semelhanças entre o perfil de crescimento dos isolados, dividindo-os em três grupos. Os isolados CBMA 234 e 293 apresentam uma fase *log* curta de aproximadamente 24 h e atingiram altas DO_{600nm}. Os isolados CBMA 247, 294, 295 e 329 atingem a fase estacionária em 48 h e uma DO_{600nm} máxima próximo a 3,0. Estes isolados, com exceção do CBMA 329, foram indicados pela CBMA/IOC como possivelmente a mesma espécie. Os isolados 271 e 326 apresentam um crescimento mais lento e DO_{600nm} baixas, entre 1,5 e 2,0. A semelhança entre esses grupos de isolados, corrobora os dados de análise filogenética propostos (item 4.3.1. Identidade genética) que os reúne, indicando que possivelmente pertençam à mesma espécie.

Para o desenvolvimento do sistema de expressão de proteínas heterólogas, busca-se um isolado que tenha uma elevada taxa de crescimento e alcance uma elevada massa bacteriana. Assim, quantidades significativas da proteína de interesse poderiam ser expressas em curtos períodos de tempo. Observando esses critérios, os isolados que mais se destacaram foram CBMA 234 e CBMA 293.

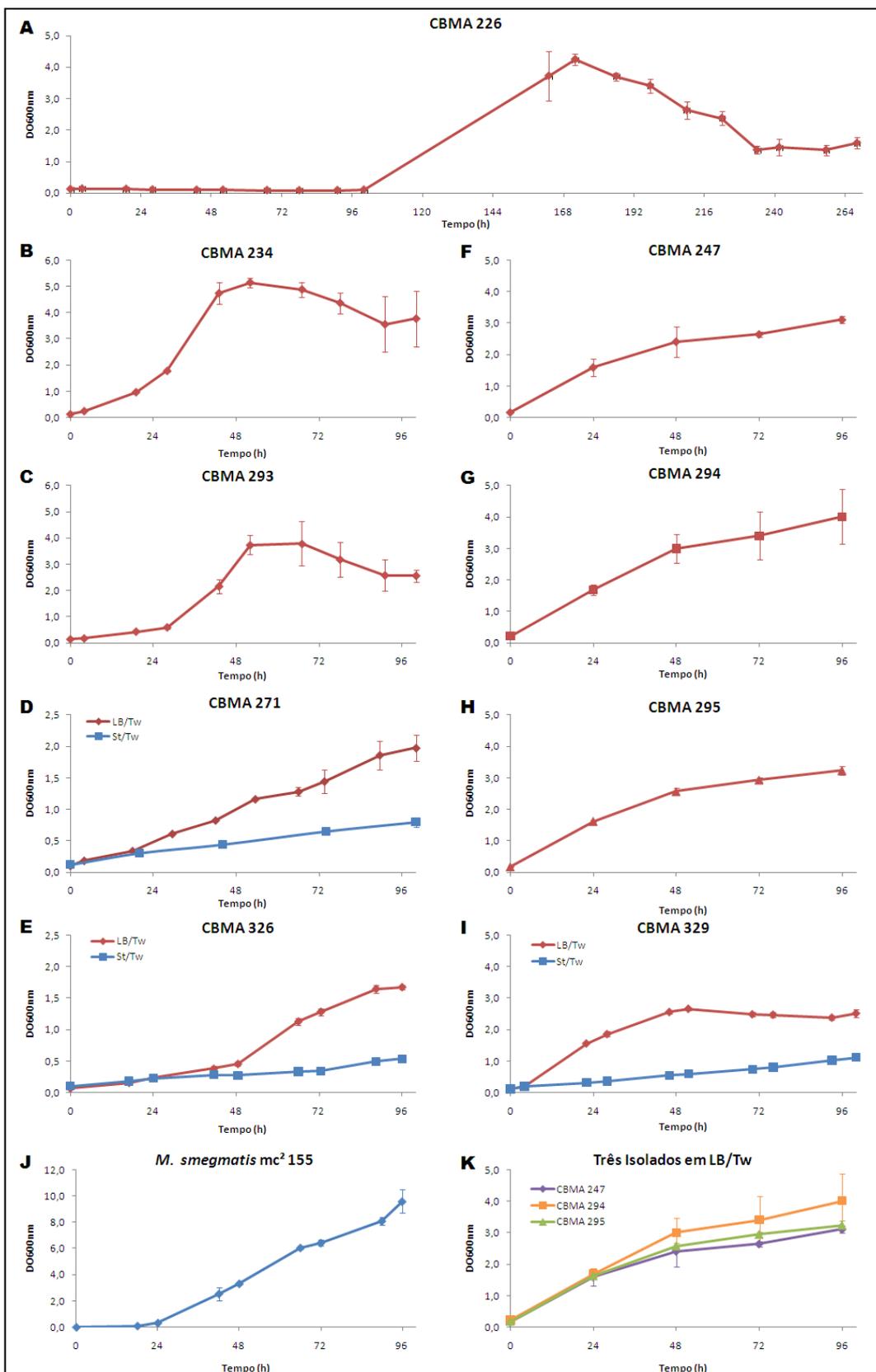


Figura 4.2: Curvas de crescimento. (A-I) Diferentes isolados da CBMA/IOC cultivados em meio LB/Tw (vermelho), a TA sob agitação. Os isolados CBMA 271 (D), CBMA 326 (E) e CBMA 329 (F) foram crescidos também em meio St/Tw (azul). (J) mc²155 cultivado em St/Tw, a 37 °C sob agitação. (K) Agrupamento de três isolados que pertencem provavelmente à mesma espécie. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

4.1.2. Morfologia

Para verificar a morfologia das colônias, os isolados foram semeados por estriamento a partir da cultura original fornecida pela CBMA/IOC em LB/Agar e crescidos a TA, ao abrigo da luz. mc²155 e *Mycobacterium bovis* BCG Moreau (BCG Moreau) foram semeados de igual modo a partir de cultura em meio LB e 7H9, respectivamente, para fins de comparação. Após 7 dias, observou-se um crescimento de colônias bem definidas, tanto dos isolados quanto de mc²155. O crescimento de colônias de BCG Moreau só foi registrado após 30 dias, conforme esperado para uma espécie micobacteriana de crescimento lento (Figura 4.3). Cada isolado apresentou características próprias conforme mostrado na Tabela 4.1.

Para verificar a morfologia microscópica, os isolados da CBMA, mc²155 e BCG Moreau foram visualizados em microscópio de luz após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen, que se baseia na característica da bactéria de possuir alto teor de lipídeos. Assim, quando tratadas pela solução de fucsina fenicada coram-se em tons róseos e persistem ao subsequente descoramento pela solução álcool-ácida, sendo conhecidas como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR). As outras bactérias, que não possuem tais paredes celulares ricas em lipídeos, têm a sua coloração pela fucsina descorada pela solução de álcool-ácido e coram-se em azul pela coloração de fundo do azul de metileno (contra-corante).

Verificou-se a tendência a formação de grumos em todos os isolados, apesar da adição de Tween 80 ao meio de cultura, e que todos se apresentam em tons róseos. No entanto, diferenças quanto à forma são nítidas: os isolados CBMA 226, 234 e 293 apresentam-se como bacilos longos e bem definidos, CBMA 271 e 326, como bacilos menores e mais grumados, e CBMA 247, 294, 295 e 329 apresentam-se em formato coco-bacilar, menores, mais grumados e de difícil visualização (Figura 4.3; Tabela 4.1). BCG Moreau apresenta-se como bacilos bem definidos, maiores e com tonalidade nítida, ao contrário de mc²155, bacilos pequenos e formando um aspecto de rede.

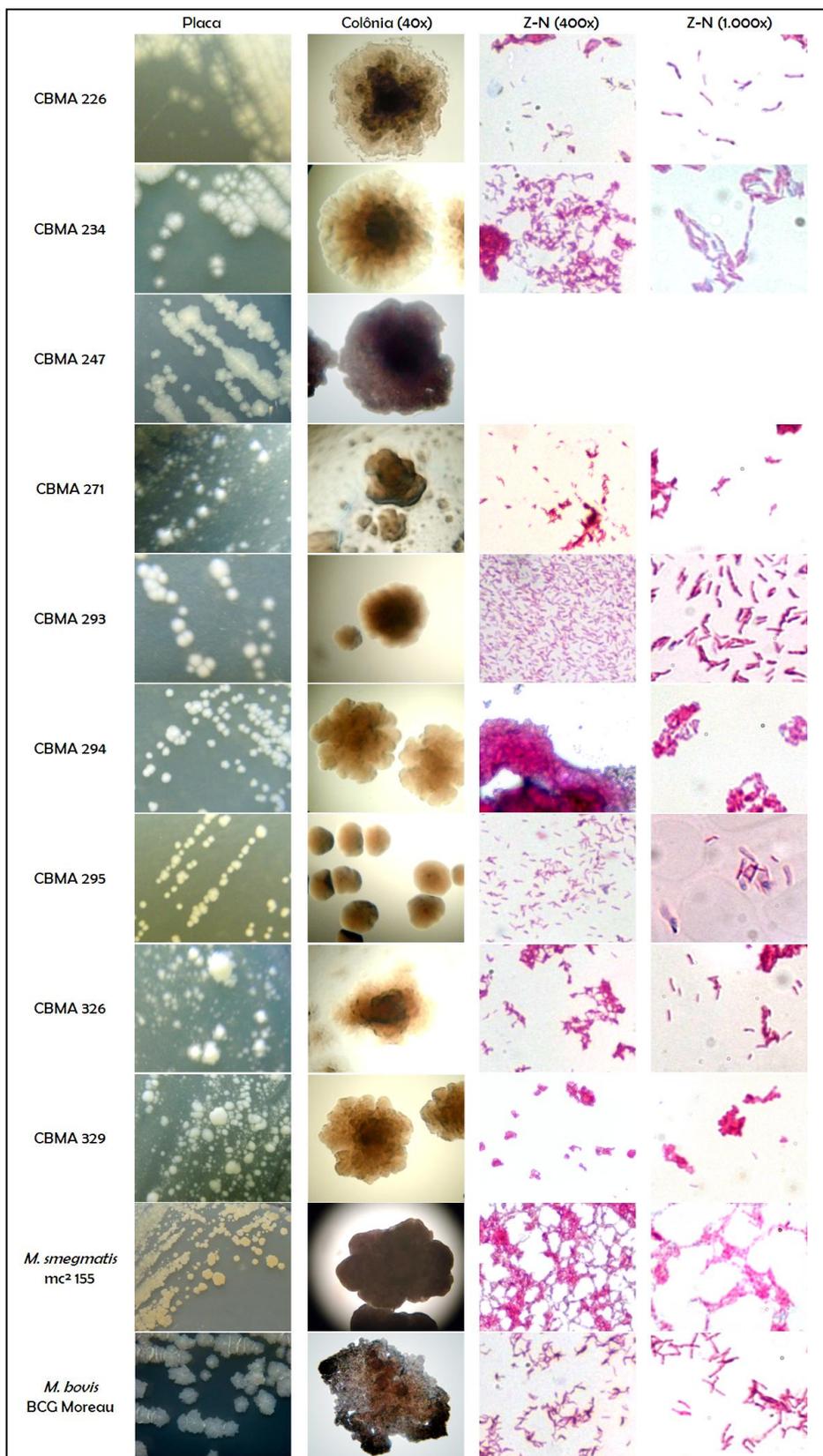


Figura 4.3: Morfologia dos isolados da CBMA. A primeira coluna mostra o aspecto geral das colônias em placa de LB/Agar; a segunda, enfoca a colônia através de aumento de 40x em microscópio de luz; a terceira e quarta coluna destacam a morfologia microscópica após coloração de Ziehl-Neelsen e visualização em microscópio de luz em um aumento de 400x e 1.000x, respectivamente. Identificação dos isolados à esquerda. mc²155 e BCG Moreau foram incluídos para comparação.

Tabela 4.1: Morfologia. Características gerais dos isolados em meio LB/ágar após 7 dias de crescimento a temperatura ambiente. mc²155 crescido a 37 °C e BCG Moreau após 30 dias de crescimento a 37 °C.

Identificação	Textura	Cor	Aspecto	Formato
CBMA 226	Rugosa	Branca*	Fosca	Bacilo
CBMA 234	Rugosa	Branca	Brilhante	Bacilo
CBMA 247	Rugosa	Branca	Fosca	Coco-bacilo**
CBMA 271	Lisa	Branca	Brilhante	Bacilo
CBMA 293	Lisa	Branca*	Brilhante	Bacilo
CBMA 294	Rugosa	Branca	Brilhante	Coco-bacilo
CBMA 295	Lisa	Branca	Fosca	Coco-bacilo
CBMA 326	Rugosa	Branca	Fosca	Bacilo
CBMA 329	Rugosa	Branca	Brilhante	Coco-bacilo
mc ² 155	Rugosa	Branca*	Fosca	Bacilo
BCG Moreau	Rugosa	Branca	Fosca	Bacilo

(*) Apresentaram tonalidade amarelada em uma análise posterior.

(**) Observado, mas não registrado em

4.1.3. Testes bioquímicos

Aspectos gerais do metabolismo bacteriano dos isolados foram avaliados através de diferentes testes bioquímicos, comumente usados para identificação e caracterização de diferentes espécies bacterianas, e comparados com mc²155 (Tabela 4.2, Figura 4.4). Estes testes foram realizados em apenas sete dos nove estudados ao longo deste estudo, onde apenas o isolado CBMA 294 foi utilizado como representativo do grupo CBMA 247, 294 e 295.

Redução de nitrato: A capacidade dos isolados usarem substâncias inorgânicas para fornecer oxigênio como aceptores finais de elétrons foi avaliada através da redução de nitrato (NO₃⁻) a nitrito (NO₂⁻). O nitrito reage com as soluções adicionadas produzindo mudança de cor para vermelho (positivo). Ausência na variação de cor caracteriza um quadro negativo (sem redução de nitrato). Os isolados CBMA 271 e 326 foram considerados negativos e os demais, inclusive mc²155, positivos (Figura 4.4 A).

Citrato: A capacidade dos isolados em usar o citrato como única fonte de carbono foi verificada pela mudança de pH gerada pela degradação do citrato

através da enzima citrase. Os produtos dessa reação (ácido oxalacético e acetato) são posteriormente convertidos em ácido pirúvico e CO_2 . O CO_2 reage com o sódio do meio formando carbonato de cálcio, tornando o pH alcalino mudando a cor do meio de laranja para vermelho (positivo). Todos os isolados e mc²155 foram considerados positivos, exceto CBMA 326 (Figura 4.4 B).

VM: A capacidade dos isolados de oxidar a glicose com produção e estabilização de altas concentrações de produtos finais ácidos foi verificada. O indicador de pH vermelho de metila tem um ponto de viragem baixo: abaixo de 4,4 muda para vermelho (positivo) e acima de 6,0, para amarelo (negativo). Todos os isolados foram considerados negativos, inclusive mc²155 (Figura 4.4 C).

VP: A realização de fermentação butilenoglicólica (fermentação da glicose produzindo acetoína, butilenoglicol e pequenas quantidades de ácidos) foi verificada pela reação de oxidação da acetoína a diacetil na presença de oxigênio atmosférico. O α -naftol, adicionado para revelação, catalisa a formação de um anel avermelhado nas culturas positivas. Todos os isolados foram considerados negativos, inclusive mc²155 (Figura 4.4 D).

Anaerobiose: A capacidade de crescer em um ambiente anóxico. Caso o crescimento seja observado apenas onde há contacto com o oxigênio (anaerobiose negativo), caracteriza-se como bactéria aeróbia. A coloração alaranjada é indicativo de contato com oxigênio. Os isolados CBMA 226, 234, 271, 294, 329 e mc²155 cresceram apenas em regiões com contato direto com oxigênio, sendo considerados aeróbios. CBMA 326 não cresceu, sendo o teste inconclusivo. O teste não foi realizado para o isolado CBMA 293 (Figura 4.4 E).

Hidrólise de gelatina: A presença de enzimas proteolíticas que hidrolisam a gelatina (gelatinases) em aminoácidos foi verificada. Considera-se positivo (presença de gelatinases) caso o meio tenha perdido as características de gel a baixas temperaturas, apresentando-se no estado líquido, devido à degradação da gelatina; e negativo, caso apresente-se em estado sólido. Assim, os isolados CBMA 293 e 326 foram considerados positivos e os demais negativos, inclusive mc²155 (Figura 4.4 F).

Sabouraud: O ágar Sabouraud é recomendado para o cultivo, isolamento e identificação de fungos devido as altas concentrações de carboidratos e pH

levemente ácido ($5,6 \pm 0,2$), o que o torna ligeiramente seletivo contra bactérias. Todos os isolados cresceram bem neste meio, inclusive mc²155 (Figura 4.3 G).

Tolerância a NaCl: A capacidade de crescer em elevadas concentrações de NaCl foi avaliada. CBMA 294 cresceu em 5, 7 e 10 % de NaCl e CBMA 329 e mc²155 cresceram em 5 e 7 % (Figura 4.4 H-J).

Hidrólise do amido: A capacidade dos isolados em hidrolisar a amilose e amilopectina, constituintes das moléculas de amido, em dextrinas, glicose e maltose, foi verificada através da presença de α -amilases em seu metabolismo. O iodo ao reagir com o amido forma um complexo azul escuro, porém, caso tenha ocorrido a hidrólise, uma zona clara forma-se ao redor da cultura (positivo). Todos os isolados foram considerados negativos (figura 4.4 K).

Lecitinase: A hidrólise da gema de ovo (lecitina) aparece sob a forma de um halo turvo contornando as colônias (positivo), podendo ser levemente corado em rosa, em contraste com o restante do meio de cultura que permanece com a cor rosa mais intensa. (figura 4.4 L). Apenas o isolado CBMA 329 foi considerado positivos.

Tabela 4.2: Testes bioquímicos. Os isolados da CBMA/IOC foram incubados a TA e revelados após 14 dias para todas as provas e mc²155 foi incubado a 37 °C e revelado após 7 dias, com exceção do teste do nitrato, 14 dias.

Teste bioquímico	CBMA 226	CBMA 234	CBMA 271	CBMA 293	CBMA 294	CBMA 326	CBMA 329	mc ² 155
Nitrato	+	+	-	+	+	-	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	-	+	+
VM	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-
Anaerobiose	-	-	-	X	-	ND	-	-
Gelatina	-	-	-	+	-	+	-	-
Sabouraud	+	+	+	+	+	+	+	+
5 % NaCl	-	-	-	-	+	-	+	+
7 % NaCl	-	-	-	-	+	-	+	-
10 % NaCl	-	-	-	-	+	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	X
Lectina	-	-	-	-	-	-	+	X

(+) Positivo, (-) Negativo, (x) Não realizado, (ND) Não determinado

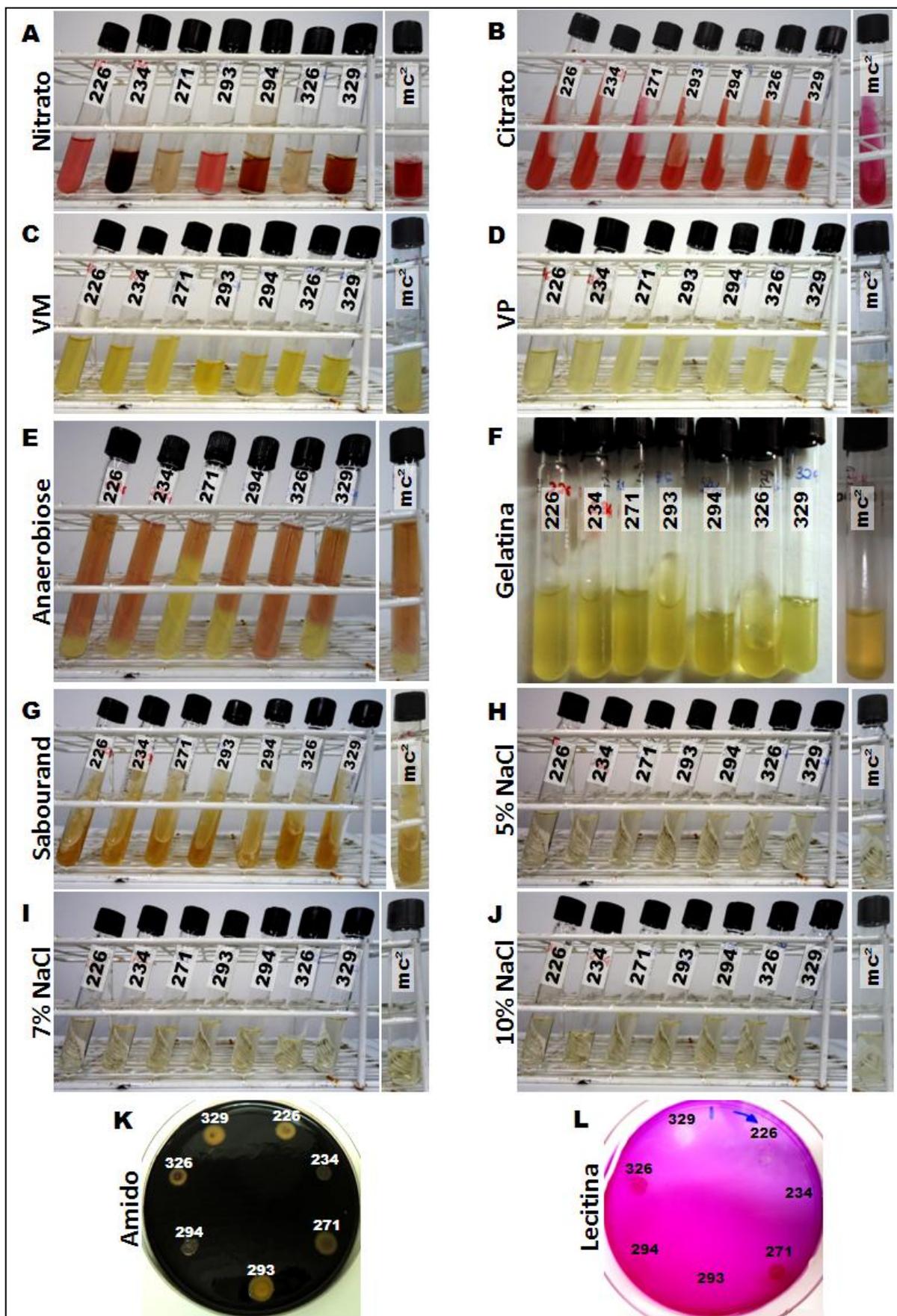


Figura 4.4: Testes bioquímicos. Isolados da CBMA/IOC crescidos a TA e revelados após 14 dias. mc²155 crescido a 37 °C e revelado após 7 dias, com exceção do nitrato, 14 dias.

4.2. Caracterização bioquímica

4.2.1. Perfil de secreção de proteínas

Avaliou-se o perfil de secreção de proteínas ao longo do crescimento para cada um dos isolados cultivados em meio LB/Tw e, também, mc²155 cultivado em meio St/Tw, através de eletroforese em gel de poliacrilamida, (SDS-PAGE, Figura 4.5). O resultado é mostrado em duplicatas, com exceção do gel referente às amostras do isolado CBMA 226, que foi crescido ao longo de um tempo maior.

CBMA 226 (Figura 4.5 A) apresenta um perfil bem diferente das demais: uma quantidade muito reduzida de proteínas secretadas é observada durante as primeiras 100 horas de crescimento (fase *lag*). Nas últimas 100 horas (final da fase *log* e fase estacionária e de declínio), ela apresenta um perfil com muitas proteínas e um aumento gradual e muito significativo na quantidade dessas proteínas.

CBMA 234 (Figura 4.5 B) e 293 (Figura 4.5 C) apresentam um perfil complexo com a presença de bandas características ao longo de toda a curva. Observa-se também um aumento gradual na quantidade de proteínas secretadas nas primeiras 72 horas, todavia, nas últimas 24 horas (fase de declínio) parece não haver alteração.

CBMA 271 (Figura 4.5 D) e 326 (Figura 4.5 E) apresentam perfis semelhantes, com a detecção de poucas proteínas secretadas ao longo de toda a curva; refletindo a baixa DO_{600nm} que alcançaram ao longo do seu crescimento: aproximadamente 2,0 na fase estacionária.

Os Isolados CBMA 247 (Figura 4.5 F), 294 (Figura 4.5 G) e 295 (Figura 4.5 H) também apresentam uma alta similaridade entre seus perfis de secreção de proteínas; sendo compatível com o resultado das curvas de crescimento (item 4.1.1) e os dados filogenéticos (item 4.3.1). Também apresentam bandas características ao longo de toda a curva, aumento gradual na quantidade de proteínas e um perfil menos complexo.

CBMA 329 (figura 4.5 I) apresenta um perfil semelhante aos três isolados anteriores, sem alteração significativa na quantidade de proteínas secretadas nas últimas 48 horas de crescimento.

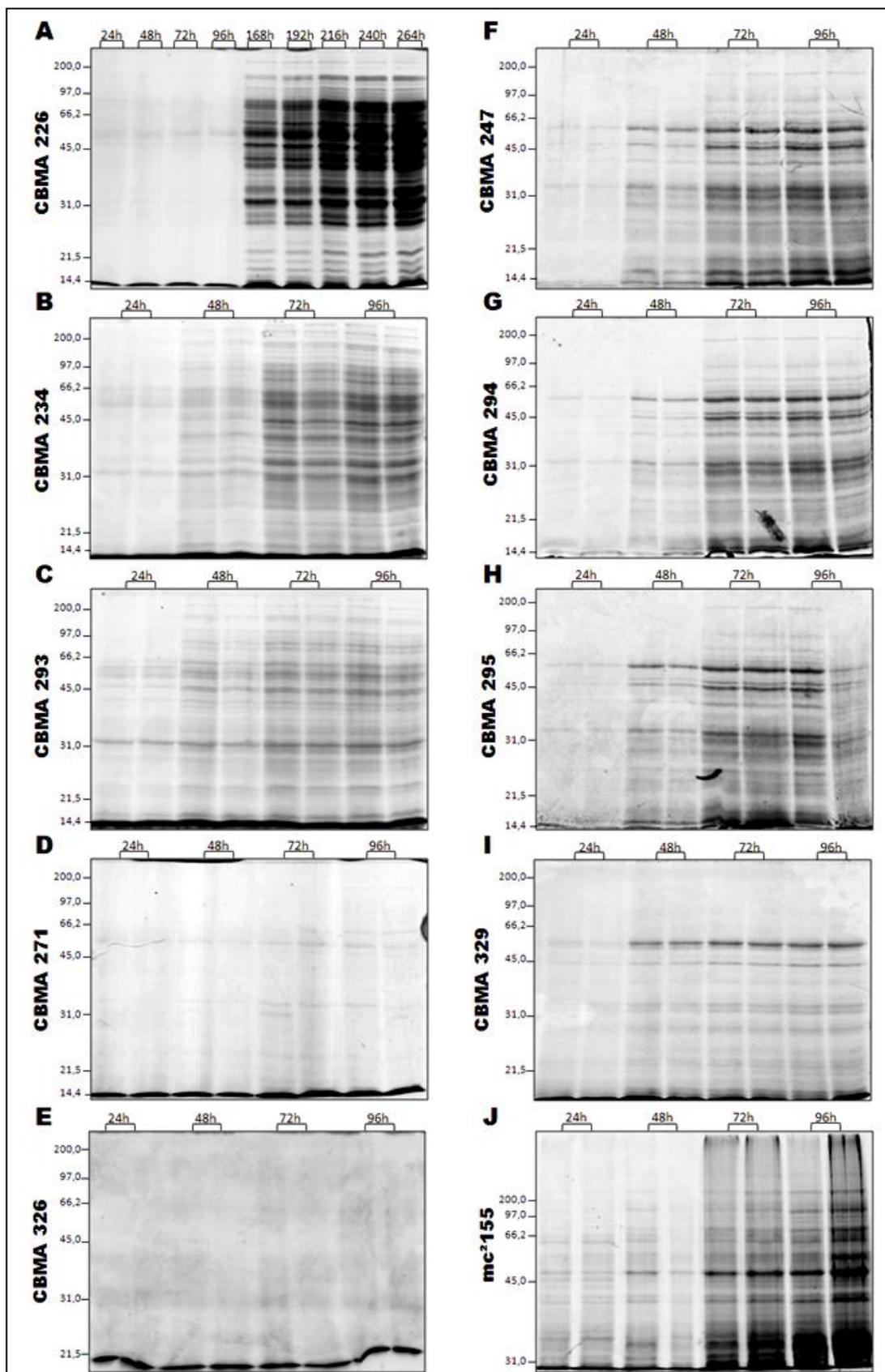


Figura 4.5: Perfil temporal de secreção de proteínas. Géis 12 % SDS-PAGE 7 cm corados com CBB-R250 com proteínas secretadas obtidas de 0,8 mL de filtrado de cultura (em duplicata) em meio LB/Tw (isolados da CBMA/IOC) ou St/Tw (mc²155), nos tempos indicados. A esquerda de cada gel, marcador de peso molecular em kDa.

mc²155 (Figura 4.5 J), que foi cultivado em meio St/Tw, apresenta, de modo geral, um perfil de secreção diferente dos isolados com pequenas semelhanças. Além disso, o fato de alcançar uma DO_{600nm} bastante elevada parece não se refletir integralmente na quantidade de proteínas secretadas para o meio de cultura. No entanto, é observado uma grande quantidade de proteínas de baixo peso molecular, podendo indicar a ação de proteases.

Além da análise temporal para cada isolado, comparou-se também o perfil de secreção de proteínas entre os diferentes isolados, no início da fase estacionária, e as suas proteínas celulares totais (Figura 4.6). Para tal comparação foi utilizado apenas um (CBMA 294) dos três isolados propostos com sendo da mesma espécie.

De maneira mais clara, é possível observar em ambos os géis semelhanças entre o perfil de proteínas secretadas de três grupos de isolados: CBMA 226, 234 e 293; CBMA 271 e 326; e CBMA 294 e 329.

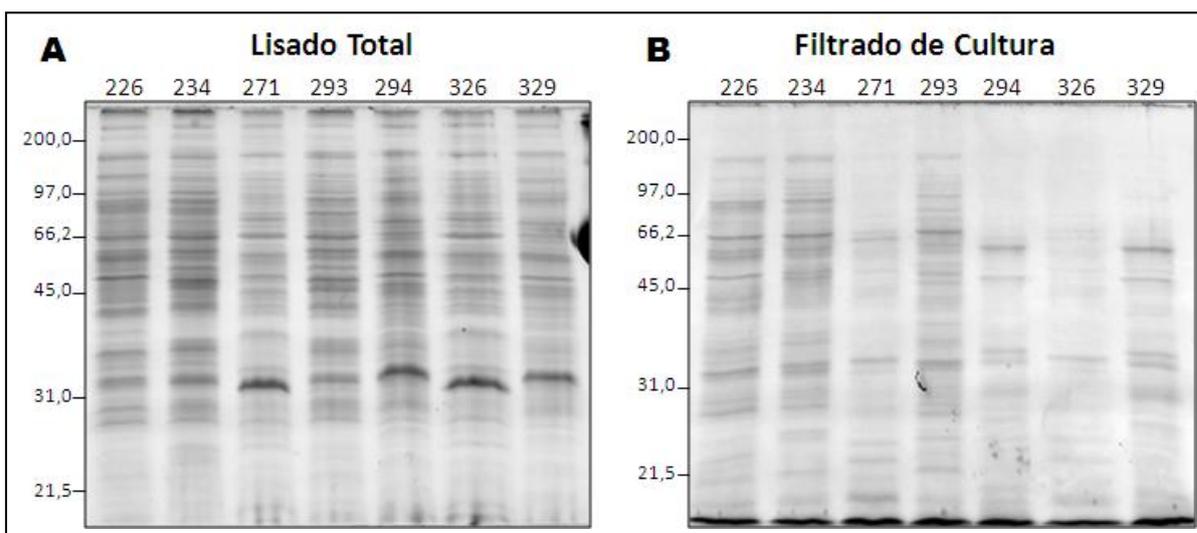


Figura 4.6: SDS-PAGE comparativo. Géis 12% SDS-PAGE 7 cm corados com CBB-R250 com 20 µg de proteína de cada amostra. A esquerda de cada gel, marcador de peso molecular em kDa.

Para o desenvolvimento de um novo sistema de expressão de proteínas heterólogas, busca-se um isolado que secrete grandes quantidades de uma pequena variedade de proteínas, favorecendo a posterior purificação da proteína de interesse. Utilizando este critério, os isolados que mais se destacaram foram CBMA 271 e 326. No entanto, em análise conjunta com o perfil de crescimento, CBMA 226, 293 e 294, parecem ser os mais promissores.

4.2.2. Secreção de proteases

Foi avaliada a presença de proteases no filtrado de cultura (FC) dos diferentes isolados da CBMA/IOC, por zimografia em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de incubação. Em paralelo a presença de proteases intracelulares foi avaliada no lisado total (LT) (Figura 4.7).

A atividade proteásica foi observada no LT, tanto em pH 5,0 quanto em pH 7,0 nos períodos de incubação de 24 e 72 horas a 28 °C, sendo a melhor condição a de 72 h em pH 7,0 (Figura 4.7 A). Todos os isolados avaliados apresentaram uma pequena atividade próximo a 66 kDa e os isolados CBMA 271 e 326 apresentaram uma atividade um pouco mais intensa próximo a 35 kDa. No entanto, nenhum dos isolados apresentou atividade no FC, nas diferentes condições empregadas (Figura 4.7 B). Todas as zimografias foram realizadas em duplicata, tendo o mesmo resultado em ambas.

Nenhum isolado apresentou atividade proteásica no FC nas condições de ensaio empregadas, no entanto, a precipitação com TCA pode ter desnaturado essas proteases impedindo que elas exerçam sua atividade. Assim, novos experimentos são necessários, utilizando outros métodos de concentração de proteínas, para determinar a presença de proteases no FC, visto que proteases secretadas poderão degradar proteínas recombinantes expressas sob forma secretada pelo sistema de expressão a ser desenvolvido.

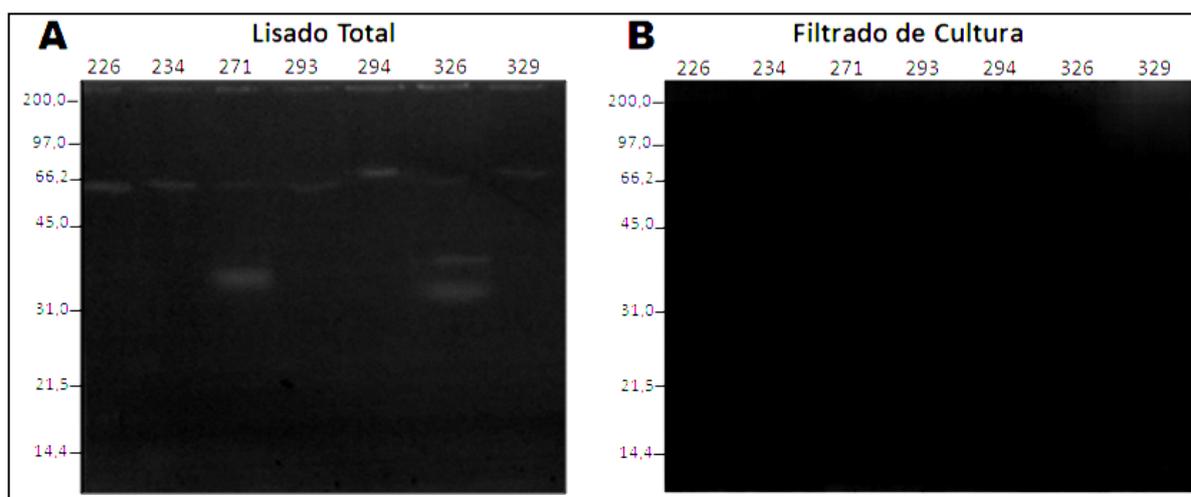


Figura 4.7: Zimografia para avaliar atividade proteásica. Gel 12 % poliacrilamida 7 cm com 0,1 % de gelatina e 20 µg de proteína por amostra, do lisado total (A) e do filtrado de cultura (B). Após a corrida, os géis foram incubados por 72 h em pH 7,0 a 28 °C e corados com CBB-R250. A esquerda de cada gel, marcador de peso molecular em kDa.

4.2.3. Produção de celulases

A produção de celulases é uma característica interessante a ser analisada, pois foi descrito que as micobactérias tuberculosas (patógenos obrigatórios) apresentam três genes que codificam para essas enzimas, estando ativas, porém sem função conhecida (Varrot *et al.*, 2005). Dessa forma é possível alguma aplicação biotecnológica caso as micobactérias ambientais, que se encontram em contato direto com a celulose, produzam essa enzima.

A presença de celulases foi avaliada por *western blot* contra as proteínas do lisado total e do filtrado de cultura dos isolados (Figura 4.8). Foi utilizado o anticorpo primário anti-CelA1 (policlonal de camundongo obtido no laboratório contra a proteína de BCG Pasteur) na diluição 1:1.000 e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de (1:10.000). O anticorpo primário foi incubado na presença de extrato de *E. coli* cepa Top10 na diluição de 1:10. Todos os isolados estudados apresentam uma banda protéica de peso molecular compatível com a proteína CelA1 de BCG Pasteur, tanto no lisado total quanto no FC. Os isolados também expressam esta proteína em quantidades maiores que BCG Pasteur.

A atividade dessa enzima foi avaliada por zimografia em meio de cultura sólido (Figura 4.9), que, embora seja um teste pouco sensível e informativo, é também simples e prático (Teather & Wood, 1982; Korpole *et al.*, 2011). Além disso, foi realizado zimografia em gel de poliacrilamida para se obter informações mais precisas sobre a enzima. Através da zimografia em meio de cultura sólido não foi possível observar atividade celulásica em nenhum dos isolados. No entanto, através da zimografia em gel, em duplicata, foi possível observar a presença de celulase apenas no lisado total após incubação dos géis por 24 horas em tampão pH 5,0 à 28 °C (Figura 4.10). Novos ensaios foram realizados variando pH para 7,0, temperatura para 37 °C e tempo de incubação para 72 horas, porém não foi possível observar atividade enzimática (dados não mostrados).

Então foi realizado, um ensaio enzimático para que a atividade dessa enzima pudesse ser mais bem caracterizada; no entanto, não foi possível detectar (Figura 4.11). Assim, observou-se que essa enzima é instável, pois perdeu sua atividade ao longo do tempo, não sendo detectada nas análises seguintes de zimografia em gel

nem neste ensaio de atividade. Da mesma forma, é possível que as celulases presentes no filtrado de cultura tenham sido desnaturadas no processo de precipitação com TCA, fazendo com que também não apresentem atividade.

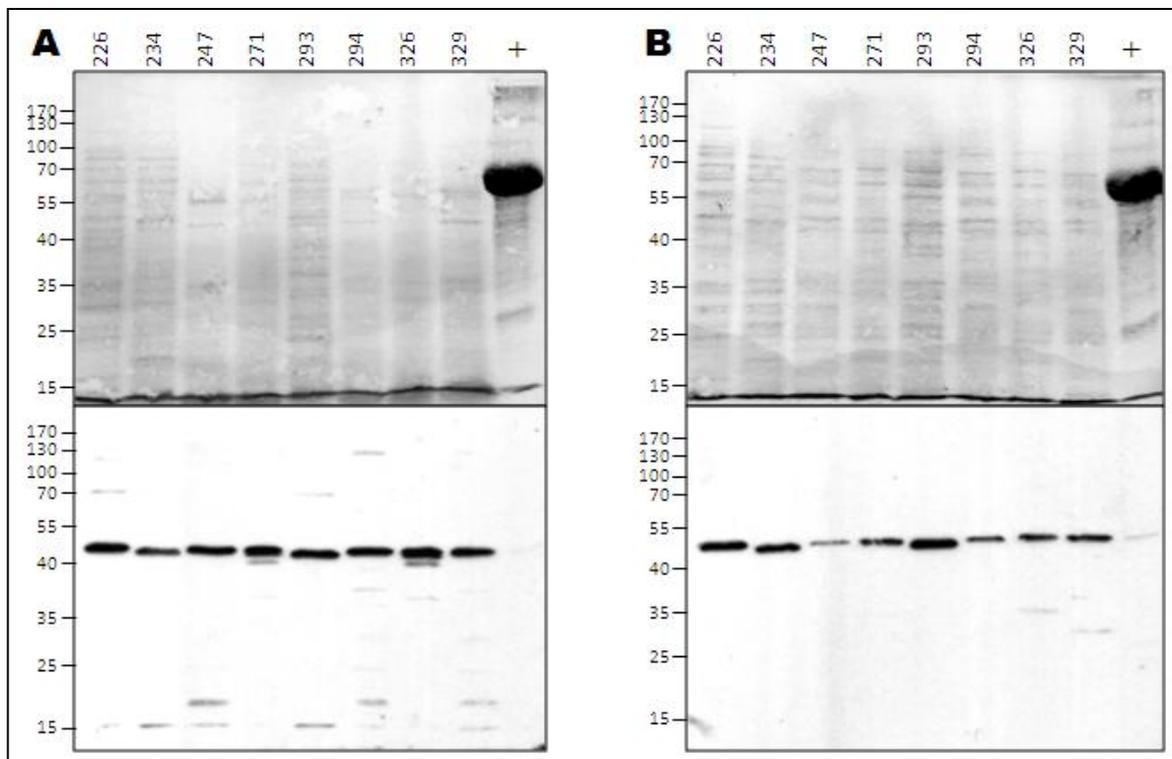


Figura 4.8: Western Blot para detectar presença de celulase. As proteínas (25 µg por canal) do lisado total (A) e do filtrado de cultura (B) foram resolvidas em gel 12 % poliacrilamida 7 cm, transferidos para membrana de nitrocelulose, coradas com Ponceau S seguido por *western blot* com anticorpo policlonal anti-CelA1. (+) Lisado total de BCG Pasteur. A esquerda de cada gel, marcador de peso molecular em kDa.

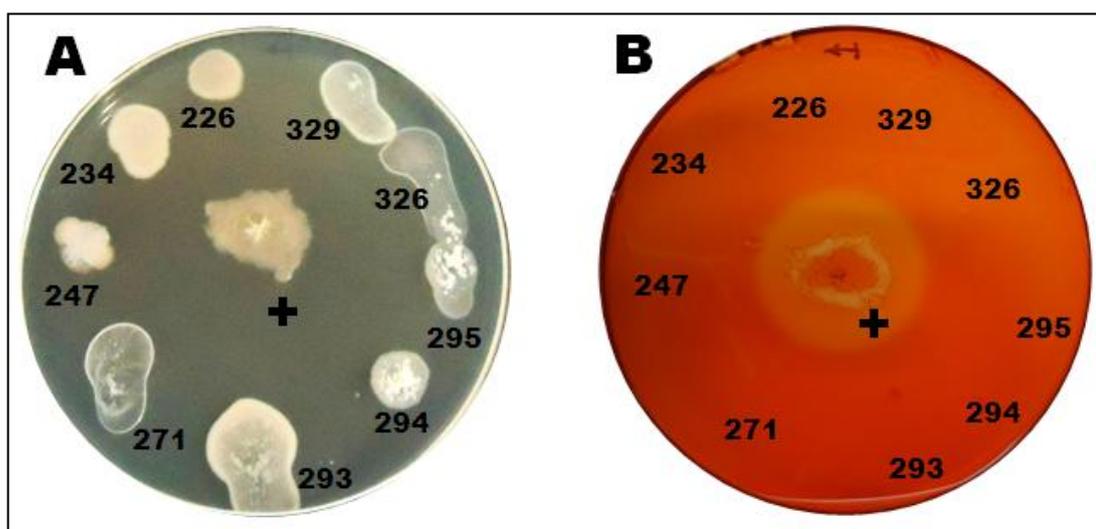


Figura 4.9: Zimografia em meio de cultura sólido para avaliar atividade celulase. Isolados crescidos em placa LB/Ágar com 0,2 % CMC, incubados a TA por 7 dias (A). Revelados com solução de vermelho do Congo e contrastados com solução de HCl 0,1 M (B). (+) *Bacillus* sp.

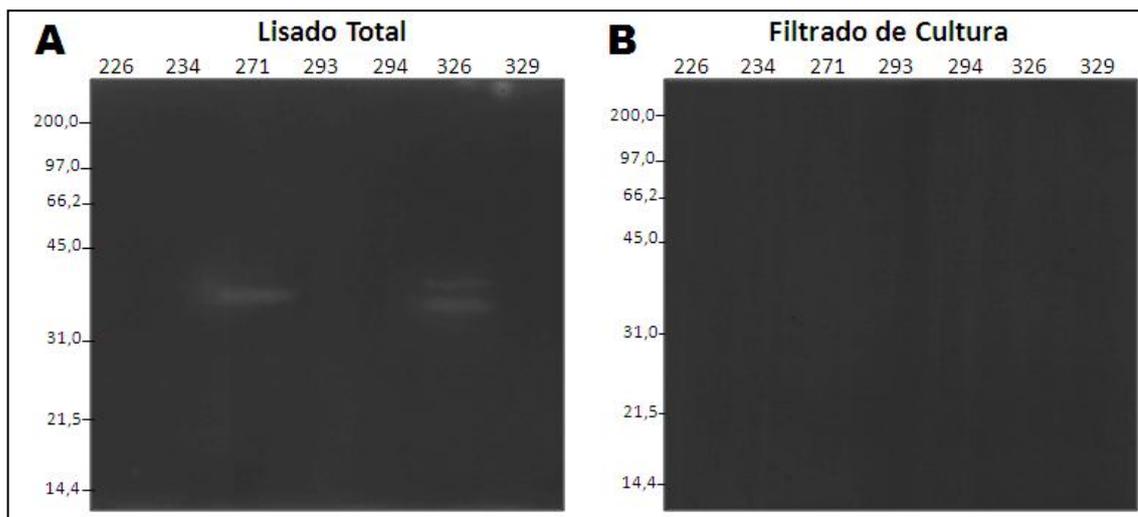


Figura 4.10: Zimografia em gel de poliácridamida para avaliar atividade celulase. Géis 12 % poliácridamida 7 cm com 0,2 % CMC e 20 µg de proteína por amostra, do lisado total (A) e do filtrado de cultura (B), incubados por 24 horas pH 5,0 a 28 °C e corados com vermelho do Congo. A esquerda de cada gel, marcador de peso molecular em kDa.

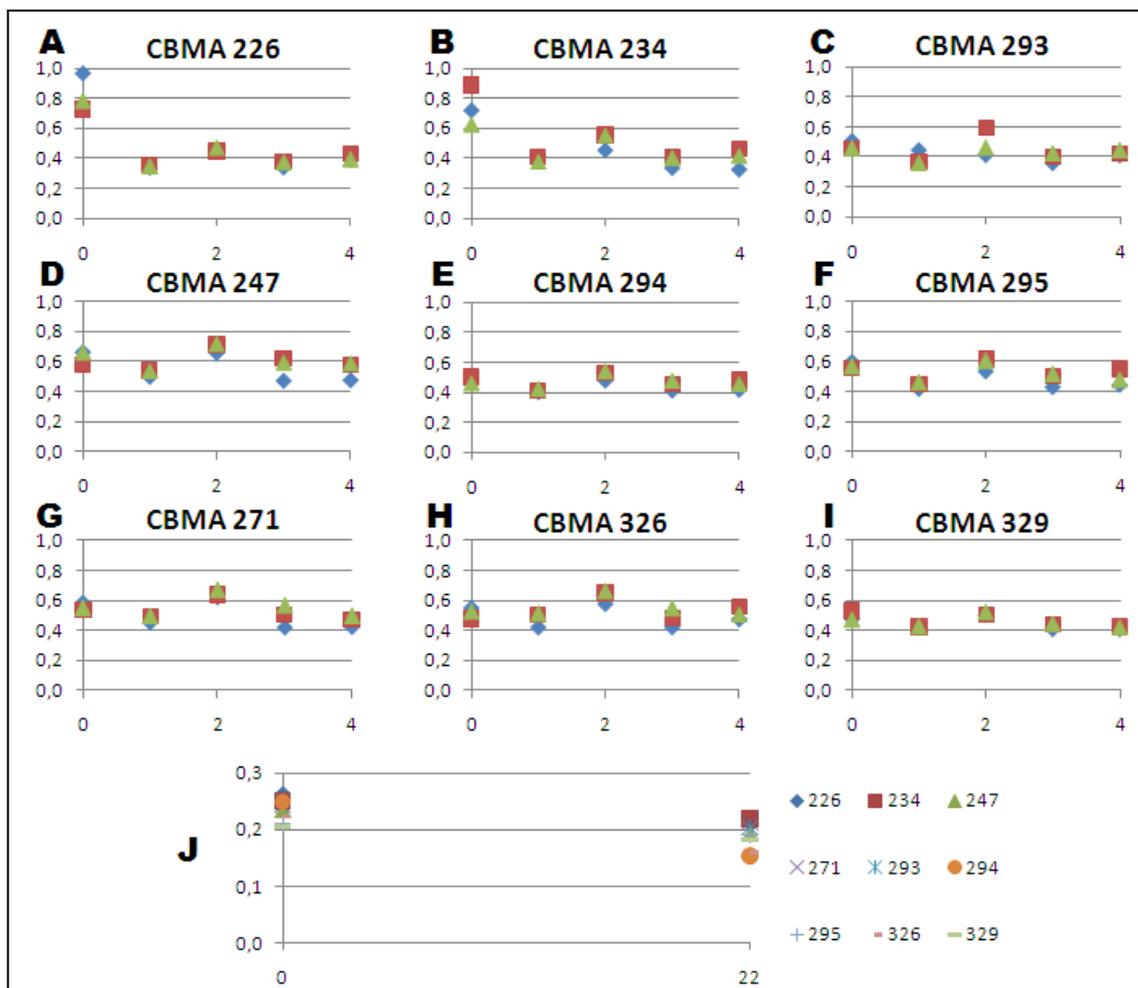


Figura 4.11: Ensaio de atividade enzimática para avaliar atividade celulase. CMC 0,5 % como substrato e leitura em espectrofotômetro a 550 nm. Amostras do lisado total (A-I) avaliadas ao longo de 4 horas, e do filtrado de cultura (J), após 22 horas. Eixo horizontal: tempo (h); vertical: concentração da atividade enzimática (U/mL). Resultados do lisado total em triplicatas.

4.3. Caracterização molecular

4.3.1. Identidade genética

Para verificar a identidade genética dos isolados, foram analisadas as sequências do gene *rrs*, amplamente utilizado para identificação bacteriana, e de um fragmento do gene *hsp65*, específico para micobactérias.

Para análise do gene *rrs*, foi realizado a PCR de um fragmento de 1500 pares de base, utilizando os iniciadores PA (forward) e PH (reverse), seguido pela purificação do produto amplificado (Figura 4.12 A) e sequenciamento de DNA, utilizando apenas o iniciador PA. As sequências obtidas foram analisadas com o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), identificando sequências com maior grau de identidade que possibilitou a classificação dos isolados da CBMA/IOC em três grupos: *M. mucogenicum*, *M. septicum* e *M. salmoniphilum* (Tabela 4.3).

Para análise do fragmento do gene *hsp65*, foi realizado a PCR de um fragmento de 441 pares de base, utilizando os iniciadores Tb11 (forward) e Tb12 (reverse) (Talentí *et al.*, 1993), seguido de purificação do produto de PCR (figura 4.12 B) e sequenciamento de DNA, utilizando ambos os iniciadores. Após análise dos cromatogramas, as sequências obtidas com o iniciador Tb12 foram descartadas, por apresentarem muito ruído devido à má qualidade do oligonucleotídeo. As sequências obtidas com o iniciador Tb11 foram analisadas contra um servidor do BLASTn desenvolvido por Dai *et al.* (2011), possibilitando a classificação dos isolados da CBMA/IOC em dois grandes grupos: *M. phocaicum-mucogenicum* e *M. septicum* (Tabela 4.4). Para fins de comparação, essas análises foram realizadas também com mc²155 e BCG Pasteur.

Para verificar a similaridade entre os isolados, as sequências obtidas foram alinhadas entre si utilizando o programa ClustalW2; sendo possível observar diferenças pontuais entre os isolados e mc²155 e uma diferença maior entre eles e BCG Pasteur. Os resultados do alinhamento para os genes *rrs* e *hsp65* estão no Anexo 2.

As árvores filogenéticas inferidas a partir dos dados do alinhamento foram similares à análise pelo BLAST. A árvore construída com base nos dados do gene

rrs (Figura 4.13 A) agrupou os isolados em três grupos distintos com valores de bootstrap superiores a 90% e mc²155 em um quarto grupo. No entanto, a árvore construída com base nos dados do gene *hsp65* (Figura 4.13 B) agrupou os isolados em dois grandes grupos, com mc²155 junto com o grupo *M. septicum*. BCG Pasteur foi considerado para ambas as árvores como grupo externo.

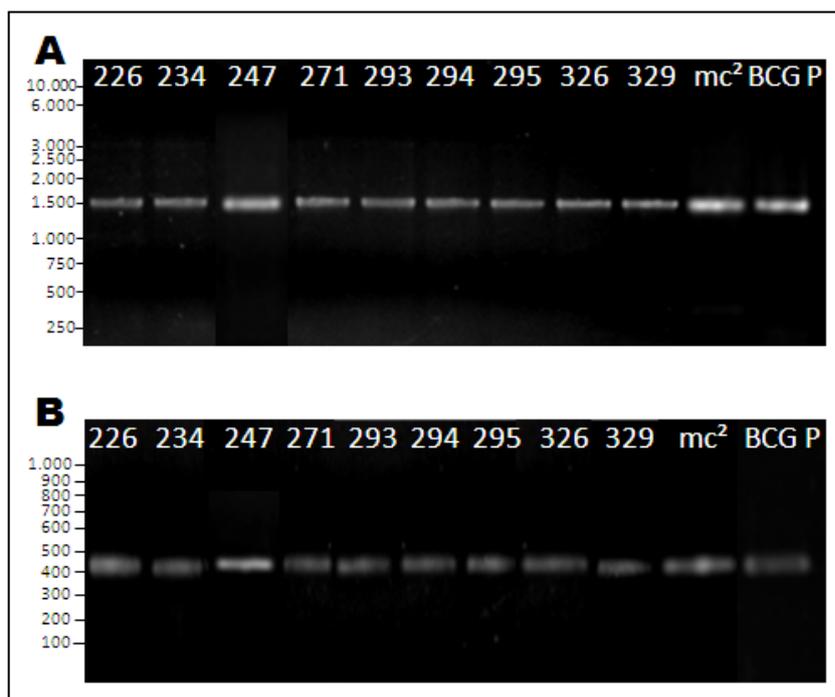


Figura 4.12: Produtos de PCR purificados. Gel de agarose 1 % em TBE corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador. (A) gene *rrs* (fragmento de 1500 pb) e (B) fragmento do gene *hsp65* (de 441 pb). A esquerda de cada gel, marcador de tamanho molecular em pb.

Tabela 4.3: Análise do gene *rrs*. BLASTn contra o banco de dados 16S ribossomal RNA sequences (Bacteria and Archea) para os isolados da CBMA/IOC, mc²155 e BCG Pasteur.

Isolado	Descrição	Score (bits)	Identidade (%)	E value
CBMA 226	<i>M. mucogenicum</i> ATCC 49650	1.509	99	0,0
CBMA 234	<i>M. mucogenicum</i> ATCC 49650	1.498	99	0,0
CBMA 247	<i>M. septicum</i> ATCC 700731	1.517	99	0,0
CBMA 271	<i>M. salmoniphilum</i> ATCC 13758	1.461	98	0,0
CBMA 293	<i>M. mucogenicum</i> ATCC 49650	1.520	99	0,0
CBMA 294	<i>M. septicum</i> ATCC 700731	1.476	99	0,0
CBMA 295	<i>M. septicum</i> ATCC 700731	1.522	99	0,0
CBMA 326	<i>M. salmoniphilum</i> ATCC 13758	1.461	98	0,0
CBMA 329	<i>M. septicum</i> ATCC 700731	1.375	99	0,0
mc ² 155	<i>M. smegmatis</i> MC2 155	1.489	100	0,0
BCG Pasteur	<i>M. bovis</i> BCG Pasteur 1173P2	1.507	100	0,0

Tabela 4.4: Análise do gene *hsp65*. BLASTn contra banco de dados desenvolvido por Dai *et al.* para os isolados da CBMA/IOC, mc²155 e BCG P.

Isolado	Descrição	Score (bits)	Identidade (%)	E value
CBMA 226	<i>M. phocaicum</i> CCUG 50185	664	97	0,0
CBMA 234	<i>M. mucogenicum</i> ATCC 49650	664	97	0,0
CBMA 247	<i>M. septicum</i> ATCC 700731	648	96	0,0
CBMA 271	<i>M. mucogenicum</i> ATCC 49650	696	98	0,0
CBMA 293	<i>M. mucogenicum</i> ATCC 49650	656	97	0,0
CBMA 294	<i>M. septicum</i> ATCC 700731	664	97	0,0
CBMA 295	<i>M. septicum</i> ATCC 700731	664	97	0,0
CBMA 326	<i>M. mucogenicum</i> ATCC 49650	672	97	0,0
CBMA 329	<i>M. septicum</i> ATCC 700731	664	97	0,0
mc ² 155	<i>M. fortuitum fortuitum</i> ATCC 6841	712	98	0,0
BCG Pasteur	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294	743	100	0,0

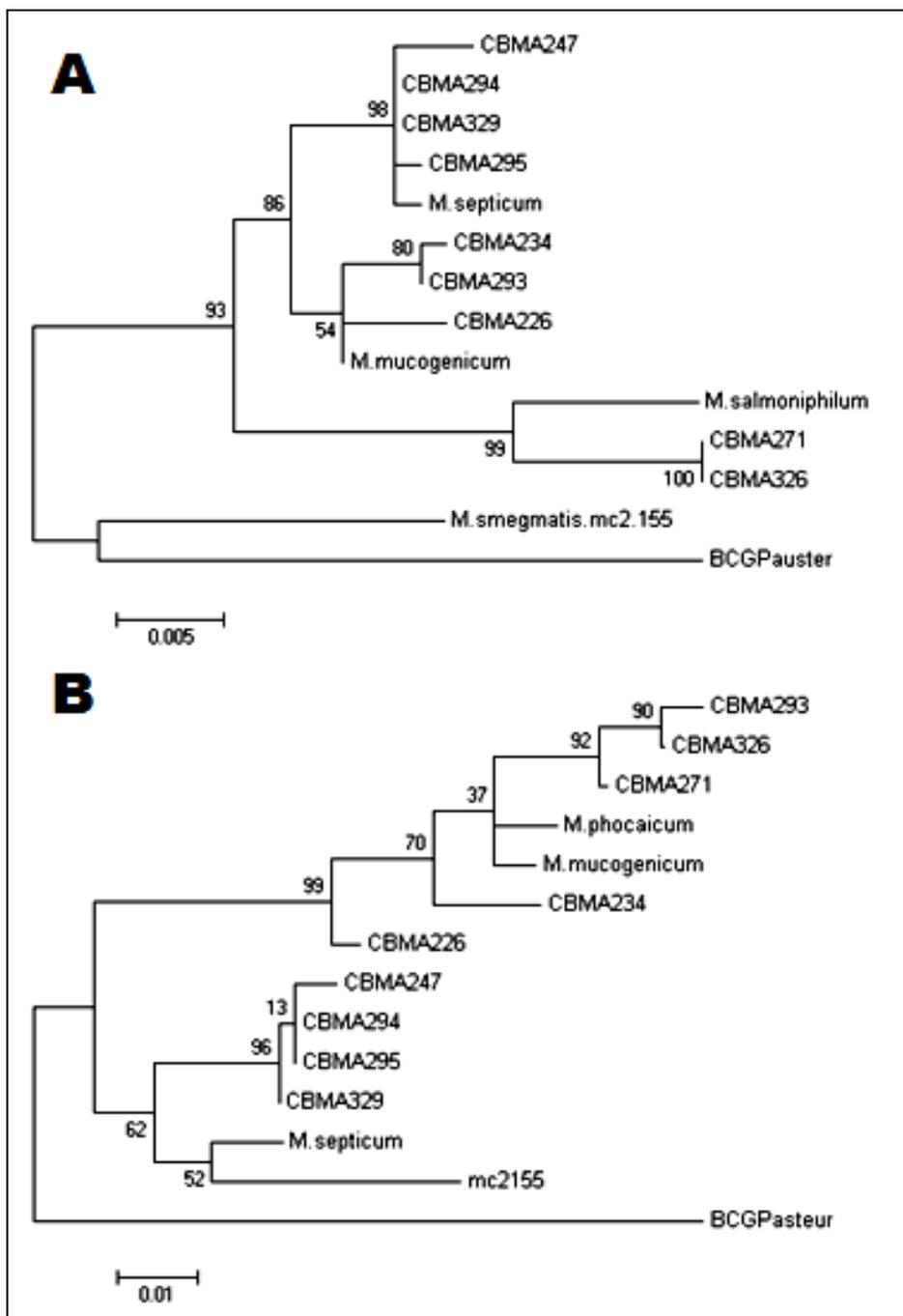


Figura 4.13: Árvores filogenéticas dos Isolados da CBMA/IOC. Filogramas construídos pelo método Máxima Verossimilhança através da análise das sequências do gene *rrs* (A) e *hsp65* (B) dos isolados da CBMA, mc²155 e BCG Pasteur como grupo externo, além das espécies de referência *M. mucogenicum*, *M. phocaicum*, *M. salmoniphilum* e *M. septicum*. Os números nos nós indicam os valores de *bootstrap* para 1.000 réplicas e a escala é equivalente ao número de substituições de nucleotídeos.

4.3.2. Capacidade de transformação

A capacidade de transformação por DNA plasmidial foi avaliada usando o vetor pUS989 (Figura 4.14 A), um vetor-ponte capaz de se replicar em *E. coli* e em

micobactérias (Medeiros *et al.*, 2002). Este vetor codifica resistência ao antibiótico canamicina, possibilitando a seleção de transformantes, além de possuir o gene codificante para a beta-galactosidase de *E. coli* sob controle do promotor constitutivo isolado de *M. paratuberculosis PAN* (Murray *et al.*, 1992), favorecendo a visualização de transformantes através de plaqueamento em meio contendo X-Gal (produção de coloração azul).

Após o crescimento da cepa de *E. coli* DH5 α , portadora deste vetor e minipreparação de DNA plasmidial com o kit “Wizard Plus SV Minipreps – DNA purification system” (Promega) (figura 4.14 B), foi realizada a quantificação do DNA plasmidial, registrando uma concentração de 0,49 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

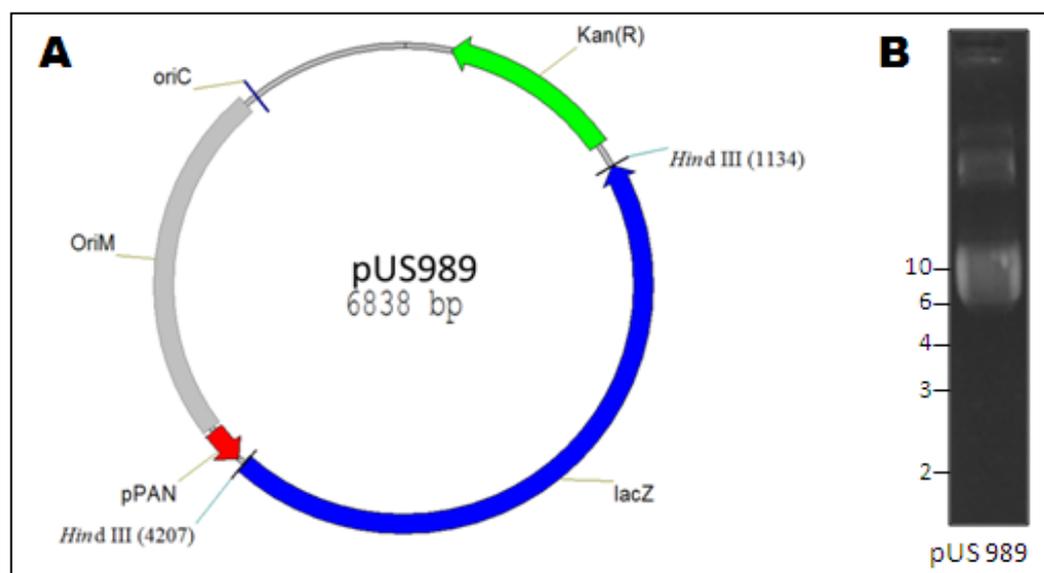


Figura 4.14: O plasmídeo pUS989. (A) Mapa do vetor portador do gene *lacZ*, codificante para a beta-galactosidase de *Escherichia coli*, sob controle do promotor micobacteriano *PAN*, com origem de replicação em *E. coli* (*oriC*) e micobactérias (*oriM*), resistência a canamicina (*Kan(R)*). (B) Miniprep de DNA do plasmídeo pUS989. Gel de agarose 1 % em TBE com 0,5 μg de DNA, corado com brometo de etídeo. A esquerda do gel, marcador de tamanho molecular em kb.

Os isolados foram previamente cultivados em meio LB/Ágar contendo 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina, de modo a verificar a capacidade de resistência a esse antibiótico. Nenhum dos isolados cresceu nesse meio (resultado não mostrado), sendo todos eles sensíveis a ação de canamicina nessa concentração.

A transformação por eletroporação foi realizada em todos os isolados e mc²155 através da adição de 1 μg de DNA plasmidial às células eletrocompetentes. Os transformantes foram selecionados em meio LB/Ágar contendo canamicina e X-Gal a partir de 100 μL da mistura de transformação. Após 7, 10 e 14 dias foi

registrado o crescimento de colônias azuis e brancas e contado a quantidade de unidades formadoras de colônia (ufc) (Figura 4.15), seguido pelo cálculo da eficiência da transformação (Tabela 4.5).

Todos isolados são transformáveis, visto que todos cresceram em meio contendo canamicina. Porém, nem todos apresentam uma integridade total do vetor, pois apresentaram colônias brancas. Ou seja, não expressaram a proteína heteróloga. Apenas mc²155 e os isolados CBMA 226 e 294 apresentaram apenas colônias azuis. CBMA 234, 247, 293 e 295 apresentaram tanto colônias azuis quanto brancas, em diferentes proporções, e CBMA 271, 326 e 329, apenas brancas.

Tabela 4.5: Cálculo da eficiência de transformação. Os transformantes foram semeados a partir de 100 µL em LB/Ágar contendo canamicina e X-Gal e incubados no período indicado.

Isolado	Dias de crescimento	Ufc		Eficiência	
		Azuis	Brancas	Azuis	Totais
CBMA 226	7	6960	-	$3,48 \times 10^5$	$3,48 \times 10^5$
CBMA 234	14	5	1068	$2,50 \times 10^2$	$5,37 \times 10^4$
CBMA 247	14	66	26	$3,30 \times 10^3$	$4,60 \times 10^3$
CBMA 271	*	-	*	-	*
CBMA 293	14	55	5	$2,75 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$
CBMA 294	10	78	-	$3,90 \times 10^3$	$3,90 \times 10^3$
CBMA 295	14	161	4	$8,05 \times 10^3$	$8,25 \times 10^3$
CBMA 326	14	-	6536	-	$3,27 \times 10^5$
CBMA 329	14	-	7	-	$3,50 \times 10^2$
mc ² 155	7	132	-	$6,60 \times 10^3$	$6,60 \times 10^3$

(*) CBMA 271 cresceu desde o início formando um tapete branco, impossibilitando a contagem de ufc e cálculo da eficiência

Comparando a eficiência de transformação dos isolados, a partir das colônias totais, com mc²155 observou-se que: (1) CBMA 329 apresenta uma redução de aproximadamente 20 vezes, (2) CBMA 226, 234 e 326 apresentaram um aumento entre 50 e 80 vezes, e (3) CBMA 247, 293, 294 e 295 apresentaram valores similares.

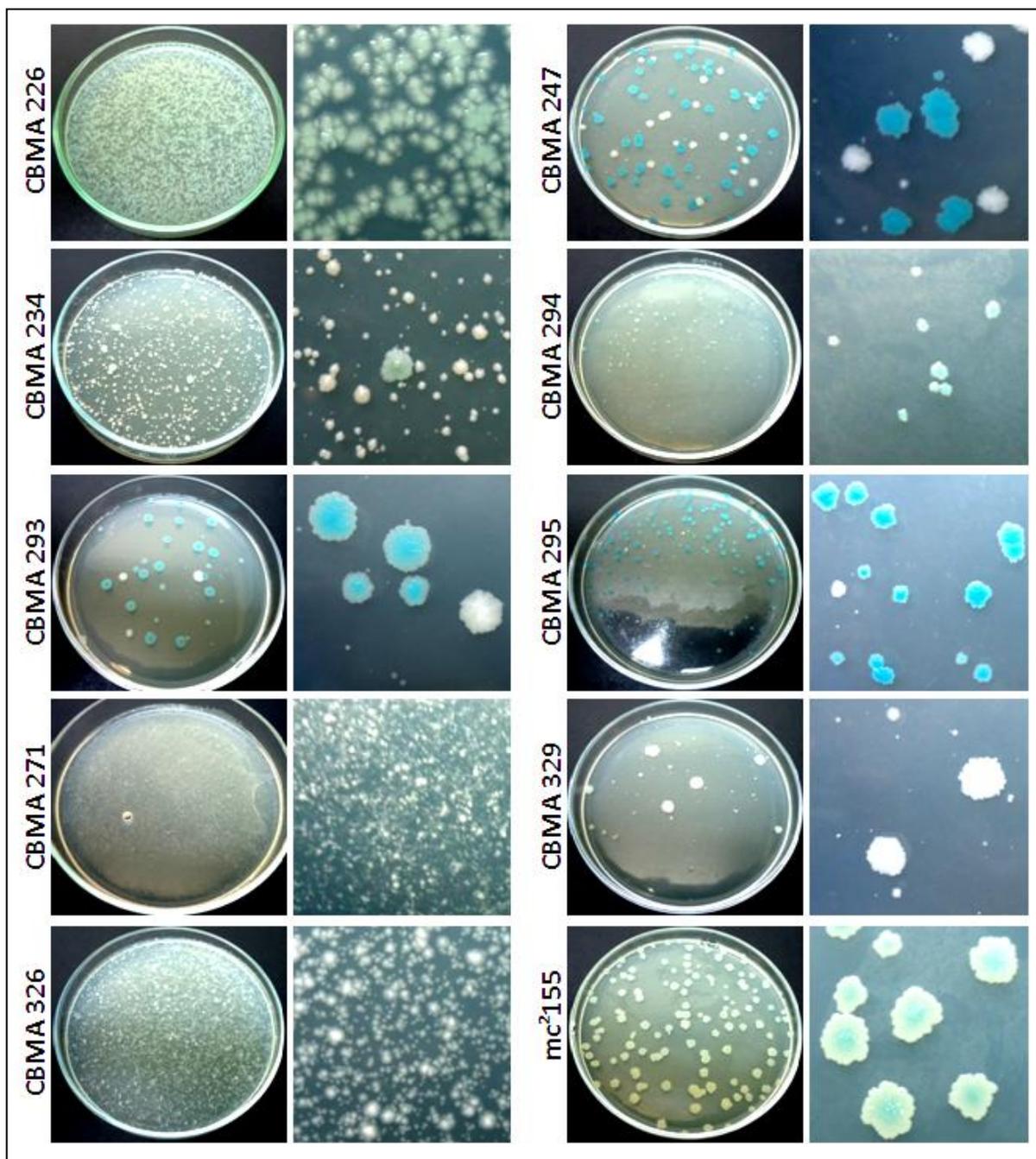


Figura 4.15: Capacidade de transformação. Isolados semeados por espalhamento a partir de 100 μ L da cultura dos transformantes em placa LB/Ágar contendo de canamicina (25 μ g/mL) e X-Gal (5 g/mL) e incubados por 14 dias. Detalhe das colônias a direita.

Para o desenvolvimento do sistema de expressão é vital que o isolado possa ser transformado e apresente a capacidade de expressar a proteína heteróloga de interesse, sendo importante também um elevado grau de eficiência e um curto período de incubação. Nessas características, destacam-se CBMA 226, 294 e 295.

4.4. Caracterização imunológica

4.4.1. Identificação de antígenos compartilhados

Para verificar a presença de antígenos compartilhados com espécies do complexo *M. tuberculosis*, foi realizado a análise por *western blot* de alguns desses antígenos no lisado total e/ou no filtrado de cultura para os 9 isolados estudados. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários nas suas respectivas diluições: anti-Mpt64 (1:1.000), anti-Mpt70 (1:1.000), anti-Mpt83 (1:1.000), anti-HspX (1:1.000), anti-GlnA1 (1:1.000) e anti-Complexo 85 (1:10.000). Os anticorpos secundários foram anti-IgG de coelho para antígenos do complexo 85 (1:50.000) e anti-IgG de camundongo para os demais antígenos (1:10.000), ambos conjugados a peroxidase (figura 4.10). Os anticorpos foram utilizados em altas concentrações com o objetivo de garantir que quantidades muito pequenas de proteínas pudessem ser detectadas.

Mpt64 é um antígeno secretado codificado pela região RD2, presente nas cepas BCG Moreau (cepa vacinal brasileira), Japão, Rússia e Suécia, mas foi deletada da cepa BCG original na década de 1920 e é um candidato para diagnóstico tanto em infecções em gado como em humanos (Roche *et al.*, 1996). Observou-se que os isolados não apresentam marcação para este antígeno no FC nem no LT (Figura 4.16).

Mpt70 é a principal proteína secretada de *M. bovis* BCG em meio Sauton (Harboe & Nagai, 1984) e estimula a resposta imune humoral e celular durante infecções com *M. tuberculosis* ou *M. bovis* (Al-Attayah *et al.*, 2003). No entanto, foi observado sua presença no LT e não no FC (Figura 4.17). O interessante é que o controle positivo apresenta duas bandas próximas a 20 kDa, enquanto que os isolados apresentam apenas uma delas e uma outra marcação próximo a 40 kDa, que é inespecífica, provavelmente uma chaperona.

Mpt83 é uma lipoglicoproteína de *M. tuberculosis*, codificada pelo gene Rv2873, com função desconhecida até o momento, mas que é encontrada superexpressa durante a infecção, sendo também altamente imunogênica e, por isso, candidata para o desenvolvimento de vacinas contra tuberculose (Kao *et al.* 2012). Apresentou apenas marcações inespecíficas próximo a 100 kDa no FC (Figura 4.18).

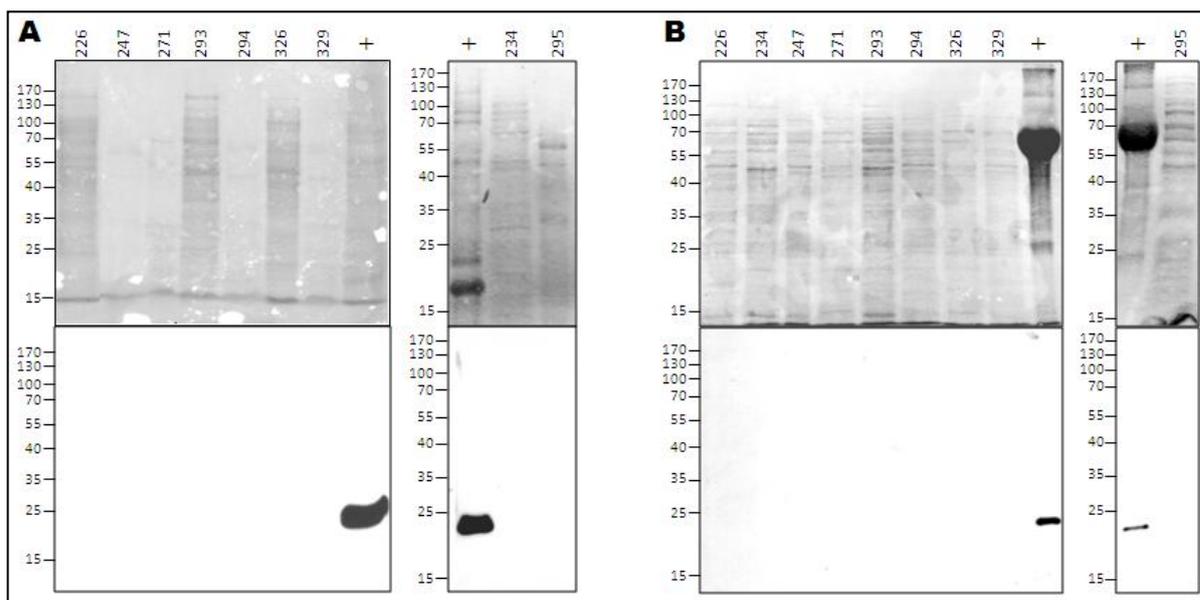


Figura 4.16: Antígenos compartilhados com o complexo *M. tuberculosis* – Mpt64. As proteínas obtidas do filtrado de cultura (A) e do lisado total (B) de BCG M (+, controle positivo) e dos isolados foram resolvidas em géis SDS-PAGE 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose, coradas com Ponceau S (parte superior), seguido por *western blot* contra o soro policlonal anti-Mpt64 (primário) e anti-IgG de camundongo (secundário) conjugado a peroxidase. A esquerda da membrana, marcador de peso molecular em kDa.

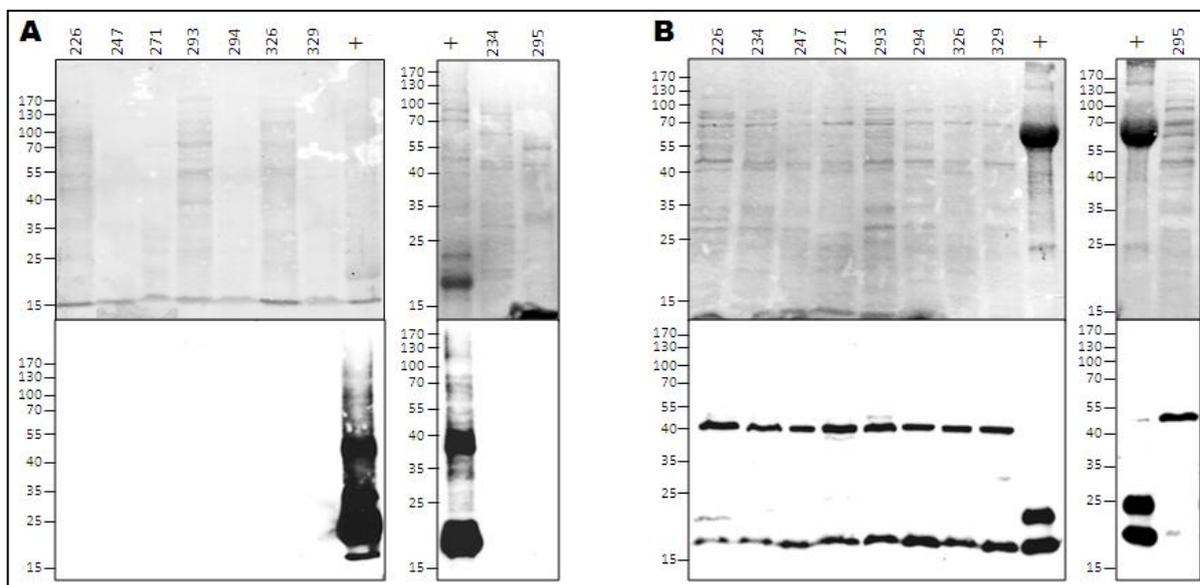


Figura 4.17: Antígenos compartilhados com o complexo *M. tuberculosis* – Mpt70. As proteínas obtidas do filtrado de cultura (A) e do lisado total (B) de BCG M (+, controle positivo) e dos isolados foram resolvidas em géis SDS-PAGE 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose, coradas com Ponceau S (parte superior), seguido por *western blot* contra o soro policlonal anti-Mpt70 (primário) e anti-IgG de camundongo (secundário) conjugado a peroxidase. A esquerda da membrana, marcador de peso molecular em kDa.

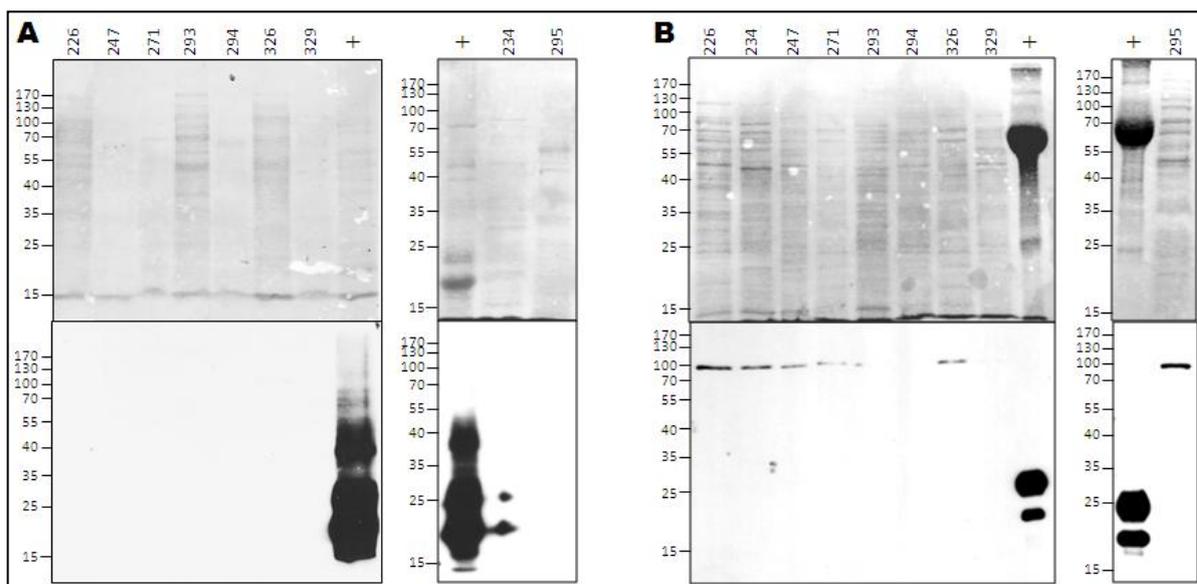


Figura 4.18: Antígenos compartilhados com o complexo *M. tuberculosis* – Mpt83. As proteínas obtidas do filtrado de cultura (A) e do lisado total (B) de BCG M (+, controle positivo) e dos isolados foram resolvidas em géis SDS-PAGE 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose, coradas com Ponceau S (parte superior), seguido por *western blot* contra o soro policlonal anti-Mpt83 (primário) e anti-IgG de camundongo (secundário) conjugado a peroxidase. A esquerda da membrana, marcador de peso molecular em kDa.

HspX (Rv2031c) é um marcador da condição de hipóxia (Majumdar *et al.*, 2010), além de ser o antígeno imuno dominante produzido por *M. tuberculosis* durante a fase de latência *in vivo* (Yuan *et al.*, 1996). Analisado apenas no LT, não apresentou marcação em nenhum dos isolados (Figura 4.19 A).

GlnA1 é a principal e essencial glutamino sintetase (enzima com papel fundamental na assimilação de nitrogênio a partir do glutamato e amônio) em *M. tuberculosis* e parece ter um papel na sua sobrevivência durante infecção e sobrevivência no hospedeiro humano (Hayward *et al.*, 2009). Foi também avaliado apenas no LT, apresentando marcação positiva para cinco dos oito isolados avaliados (CBMA 226, 234, 247, 293 e 294) (Figura 4.19 B). Embora o controle positivo não esteja muito nítido, a marcação está na altura esperada de 53,5 kDa.

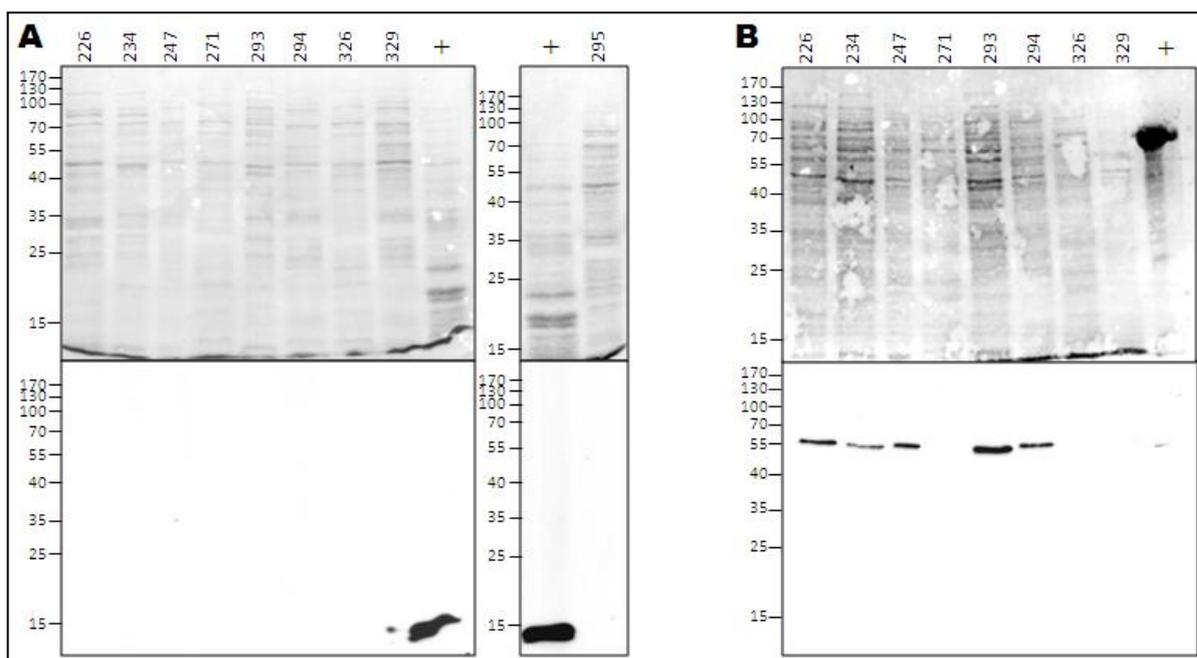


Figura 4.19: Antígenos compartilhados com o complexo *M. tuberculosis* – HspX e GlnA1. As proteínas obtidas do lisado total de BCG M (+, controle positivo) e dos isolados foram resolvidas em géis SDS-PAGE 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose, coradas com Ponceau S (parte superior), seguido por *western blot* contra o soro policlonal anti-HspX (A) ou anti-GlnA1 (B) (primário) e anti-IgG de camundongo (secundário) conjugado a peroxidase. A esquerda da membrana, marcador de peso molecular em kDa.

O complexo do antígeno 85 é composto por três distintas trealose dimicolil transferases, Ag85A, Ag85B e Ag85C (codificado pelos genes *fbpA*, *fbpB*, e *fbpC*), que estão envolvidos na deposição de micolato e na biosíntese tanto dos ácidos micólicos quanto da parede celular, sendo críticos para a construção da parede celular micobacteriana normal e crescimento celular (Belisle *et al.*, 1997). Ao contrário de HspX e GlnA1, o Ag85 foi analisado apenas no FC, onde os isolados apresentaram a marcação na região esperada, próximo a 35 kDa, com exceção de CBMA 234 (Figura 4.20). Pelo fato do anticorpo ser policlonal, regiões inespecíficas foram marcadas.

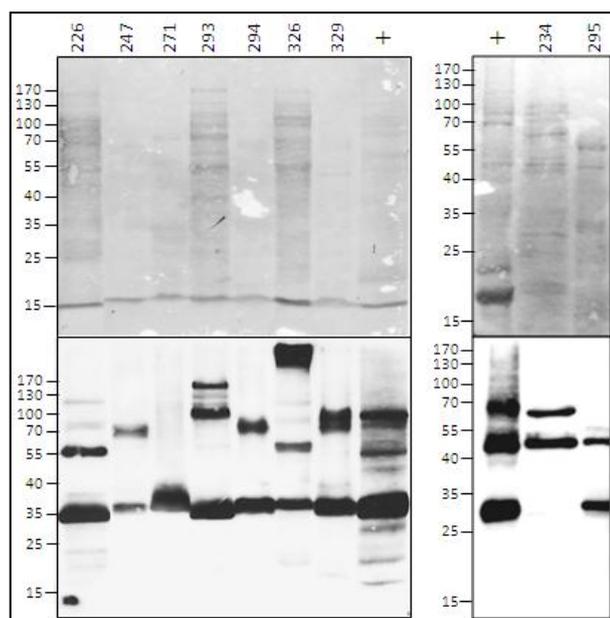


Figura 4.20: Antígenos compartilhados com o complexo *M. tuberculosis* – Ag85. As proteínas obtidas do filtrado de cultura de BCG Moreau (+, controle positivo) e dos isolados foram resolvidas em géis SDS-PAGE 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose, coradas com Ponceau S (parte superior), seguido por *western blot* contra o soro policlonal anti-Ag85 (primário) e anti-IgG de coelho (secundário) conjugado a peroxidase. A esquerda da membrana, marcador de peso molecular em kDa.

Tabela 4.6: Western blot.

Antígeno	Mpt64		Mpt70		Mpt83		HspX	GlnA1	Ag85
	LT	FC	LT	FC	LT	FC	LT	LT	FC
CBMA 226	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CBMA 234	-	-	-	+	-	-	-	+	-
CBMA 247	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CBMA 271	-	-	-	+	-	-	-	-	+
CBMA 293	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CBMA 294	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CBMA 295	-	-	-	+	-	-	-	X	+
CBMA 326	-	-	-	+	-	-	-	-	+
CBMA 329	-	-	-	+	-	-	-	-	+
BCG Moreau	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) positivo, (-) negativo, (x) não realizado

5. Discussão

A caracterização dos isolados micobacterianos da Coleção de Bactérias da Mata Atlântica teve por objetivos principais selecionar espécies candidatas para o desenvolvimento de um novo sistema de expressão de proteínas recombinantes e verificar a presença de antígenos compartilhados com a vacina BCG, que poderiam influenciar na resposta imune contra a tuberculose. Assim, diversos aspectos abordados neste estudo diferem de uma caracterização clássica de um novo microorganismo.

5.1. Aspectos microbiológicos e identidade molecular

Os meios de cultura mais utilizados para isolamento e estudo de micobactérias são o meio líquido Middlebrook 7H9 e os meios sólidos Lowenstein Jensen (LJ), Middlebrook 7H10 e Middlebrook 7H11, suplementados com ADC (Medeiros *et al.*, 2002; MS, 2005; Zimbro *et al.*, 2009; Noens *et al.*, 2011; Tortoli *et al.*, 2013). No entanto, foi utilizado o meio LB e LB/ágar para o cultivo dos isolados da CBMA por ser muito utilizado em procedimentos de biologia molecular, principalmente para manutenção e propagação de culturas de *E. coli*, mas também utilizado para cultivo de outros procariontes (Miller, 1972; Miyake *et al.*, 2007; Zimbro *et al.*, 2009; Andrejko *et al.*, 2013). Este meio também já foi utilizado para procedimentos em micobactérias, demonstrando resultados similares ao Middlebrook 7H9 para cultivo de micobactérias de crescimento rápido, como *M. smegmatis* (Stephanou *et al.*, 2007). De maneira geral, as MNT crescem melhor em temperaturas entre 25 e 45 °C (Tortoli, 2003 e 2006, Tortoli *et al.*, 2013), porém os isolados da CBMA crescem muito pouco ou não crescem em temperaturas acima de 25 °C, sendo 22 °C a temperatura ótima. Um resultado similar foi observado em *M. minnessotense*, isolado de um pântano em Minnessota (EUA), onde o crescimento a 28 °C mostrou-se de 2 a 3 vezes melhor que a 37 °C (Hannigan *et al.*, 2013) e em *M. llatzerense*, isolada de um sistema de distribuição de água de uma unidade de hemodiálise em Mallorca (Espanha), que cresce em 3 a 4 dias entre 22 e 30 °C, mas não cresce a 37 ou 45 °C (Gomila *et al.*, 2008).

Embora o crescimento bacteriano seja tradicionalmente avaliado pela contagem de unidades formadoras de colônias (Tortora *et al.*, 2005), foi utilizado a leitura da DO_{600nm}, pois tem sido bastante comum na determinação e padronização do momento ótimo para indução de uma cultura em procedimentos de expressão de proteínas e para o preparo de células eletrocompetentes (Caldwell, 1995; Matlock *et al.*, 2011). Além disso, diferentes estudos de biologia molecular em micobactérias têm utilizado esta metodologia (Feuerriegel *et al.*, 2010; Noens *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012; Leão *et al.*, 2013). As micobactérias isoladas da Mata Atlântica são de crescimento rápido, com surgimento de colônias em meio sólido em até cinco dias, devido ao protocolo utilizado no seu isolamento (Bruce *et al.*, 2010). Este é um requisito fundamental para o desenvolvimento de um sistema de expressão de proteínas e, por esse motivo, seu crescimento foi avaliado ao longo das primeiras 100 horas.

A morfologia das colônias, comumente caracterizada em meio LJ, 7H10 ou 7H11, foi observada em meio LB/ágar, diferindo do padrão usado para micobactérias (Kazda *et al.*, 1990; Torkko *et al.*, 2000; Adékambi *et al.*, 2006; Toney *et al.*, 2010; Tortoli *et al.*, 2013). No entanto, segundo análises preliminares em 7H10 e LB/ágar e estudos que utilizaram meio 5 % sangue de carneiro/ágar ou Dubos/ágar, a morfologia das colônias parece não ser alterada entre esses diferentes meios (Schinsky *et al.*, 2000; Gomila *et al.*, 2008; Saini *et al.*, 2009). É descrito que as MNT podem apresentar variações morfológicas dentro da própria espécie após várias passagens, onde algumas espécies exibem uma maior suscetibilidade devido ao conteúdo de lipídios (Belisle & Brennan, 1989; Agustí *et al.*, 2008). Assim, micobactérias que apresentam um aspecto liso (ou levemente enrugado) e úmido contém lipooligossacarídios, enquanto que o aspecto rugoso e seco é característico da ausência dessas moléculas (Belisle & Brennan, 1989). Essas características foram observadas nos isolados da CBMA/IOC, verificando-se diferenças claras quanto ao aspecto das colônias, em especial no isolado CBMA 293, que após algumas passagens apresentou colônias amareladas.

Os testes bioquímicos foram essenciais para identificação das micobactérias até as décadas de 1980 e 1990, quando os métodos genotípicos passaram a ser amplamente utilizados nesse processo (Tortoli, 2003). No entanto, esses testes continuam a ser realizados atualmente na descrição de novas espécies (Tortoli,

2003 e 2006; Hannigan *et al.*, 2013; Shojaei *et al.*, 2013; Tortoli *et al.*, 2013). Os principais testes realizados em micobactérias são para detecção de atividade arilsulfatase e catalase, utilização de citrato como fonte de carbono, crescimento em ágar MacConkey, hidrólise de Tween 80, redução do nitrato, tolerância ao NaCl, além da resistência a diferentes antimicrobianos (Schinsky *et al.*, 2000; Tortoli 2003 e 2006, Adékambi *et al.*, 2006; Whipps *et al.*, 2007; Hannigan *et al.*, 2013; Shojaei *et al.*, 2013; Tortoli *et al.*, 2013). Assim, neste estudo foram realizados diversos testes bioquímicos, entre eles alguns classicamente utilizados para o estudo de micobactérias e outros amplamente utilizados na caracterização de diversos isolados ambientais. Resultados negativos eram esperados para o teste do vermelho de metila (VM) e Vogues-Proskauer (VP), visto que são testes mais específicos para enterobactérias; para anaerobiose, pois micobactérias são classicamente caracterizadas como aeróbias; e para hidrólise do amido, comum em *Bacillus sp.* (Tortora, 2005). O resultado positivo de todos os isolados e de mc²155 para o crescimento em meio Sabouraud não era esperado, por este ser um meio para fungos e ligeiramente seletivo contra bactérias; no entanto é facilmente entendido pela resistência das micobactérias a ambientes adversos (Ajello *et al.*, 1963; MacFaddin, 1985). O uso do citrato como fonte de carbono, a redução do nitrato e a tolerância ao NaCl são características específicas de cada espécie micobacteriana.

Os isolados foram agrupados em três diferentes grupos segundo análise através do programa BLASTn da sequência do gene *rrs* e do gene *hsp65*: *M. mucogenicum*-*M. phocaicum*, *M. septicum* e *M. salmoniphilum*. *M. salmoniphilum* foi isolado originalmente de salmões contaminados provenientes do estado de Washington (EUA) e posteriormente encontrado também em outros estados americanos, Reino Unido e Austrália. Cresce bem em meio sólido após 4 a 6 dias, a 20 °C e entre 28 a 30 °C, mas não cresce a 37 °C; apresenta colônias lisas e brilhantes sem pigmentação e bacilos delgados e retos ou ligeiramente curvos, positivos para utilização de citrato e negativos para redução de nitrato e tolerância a 5 % de NaCl (Whipps *et al.*, 2007). *M. mucogenicum* foi isolado originalmente de fluido peritonal de paciente com peritonite no noroeste dos EUA. Cresce após 2 a 4 dias em meio sólido, entre 28 e 37 °C, mas não cresce a 42 °C; apresenta colônias lisas, mucóides e esbranquiçadas e bacilos curvos; utiliza citrato como única fonte de carbono, apresenta níveis variados de redução do nitrato e não exibe tolerância a

NaCl (Springer *et al.*, 1995). *M. phocaicum* foi isolada do aspirado bronquial de um paciente da Focea, cidade marítima de Atenas (Grécia). Cresce após 2 a 5 dias, entre 24 e 37 °C (temperatura ótima 30 °C), mas não cresce a 42 °C; são organismos com formato bacilar e colônias sem pigmentação, positivo para utilização do citrato e redução do nitrato, mas sem tolerância a 5 % de NaCl (Adékambi *et al.*, 2006). *M. septicum* foi isolado originalmente de três culturas de sangue e da ponta de um cateter venoso retirados de um menino de dois anos com hepatoblastoma metastático em Melbourne (Austrália) (Hogg *et al.*, 1999). Cresce em menos de 7 dias, a 28 °C, mas não cresce a 42 °C; apresenta colônias rugosas e ligeiramente beges, formato cocobacilar e frequentemente forma filamentos longos; são positivos para utilização do citrato, redução do nitrato e crescimento em 5 % NaCl (Schinsky *et al.*, 2000).

CBMA 271 e 326 apresentaram alta similaridade, segundo análise no BLASTn da sequência do gene *rrs*, com *M. salmoniphilum* e, pela análise do gene *hsp65*, com *M. mucogenicum* e *M. phocaicum*, juntamente com CBMA 226, 234 e 293. As semelhanças existentes entre os isolados CBMA 271 e 326 quanto ao perfil de crescimento (crescimento tardio e DO_{600nm} baixa), testes bioquímicos (negativo para redução de nitrato e tolerância a 5 % de NaCl) e morfologia microscópica (bacilos delgados e com grande tendência a formação de grumos) são nítidas. No entanto, ao compararmos esses isolados com CBMA 226, 234 e 293, as diferenças são nítidas, sugerindo que a previsão da proximidade filogenética proposta a partir dos dados do sequenciamento do gene *rrs* foi mais precisa que a dos dados do *hsp65*. Ao se comparar CBMA 271 e 326 com as espécies de referência, há maior semelhança desses isolados com *M. salmoniphilum*, devido ao perfil de crescimento, morfologia microscópica e resultado negativo para redução de nitrato, reforçando o agrupamento proposto com base no sequenciamento do gene *rrs*. No entanto, CBMA 271 e 326 diferem entre si quanto à morfologia das colônias e à utilização do citrato como única fonte de carbono, sendo necessários mais estudos para classificá-los como diferentes isolados dentro da mesma espécie.

CBMA 226, 234 e 293 apresentaram alta similaridade com *M. mucogenicum* (*rrs* e *hsp65*) e *M. phocaicum* (*hsp65*). Essa similaridade entre os isolados e entre os isolados e as espécies de referências é comprovada pelos testes bioquímicos, nos quais diferem apenas em relação à atividade gelatinase da CBMA 293, e pela

morfologia microscópica, onde os bacilos corados pela técnica de Zielh-Neelsen apresentam-se bem definidos e ligeiramente curvos. Contudo, as diferenças exibidas entre eles quanto ao perfil de crescimento – em especial CBMA 226, que apresenta um crescimento tardio – e morfologia das colônias explicam a distribuição ramificada nas árvores filogenéticas propostas. Para realizar uma identificação mais confiável destes isolados é necessário a análise de sequência de DNA de outros alvos, como *rpoB*, mais utilizado em micobactérias de crescimento rápido, ou *sodA* e *recA*, e outros testes bioquímicos, em especial atividade penicilinase e fosfatase alcalina, pois *M. mucogenicum* e *M. phocaicum* são espécies muito próximas filogeneticamente, apresentando 100 % de similaridade na sequência do gene *rrs*, porém diferem nesses pontos (Adékambi *et al.*, 2006; Tortoli, 2006).

CBMA 247, 294, 295 e 329 apresentaram alta similaridade com *M. septicum* tanto para o gene *rrs* quanto para *hsp65*. Esta similaridade é notória ao observarmos o perfil de crescimento, pois os quatro isolados alcançam a fase estacionária em aproximadamente 48 horas, com uma OD_{600nm} em torno de 3,0. O resultado dos testes bioquímicos, a morfologia das colônias e as árvores filogenéticas obtidas a partir da análise de ambos os alvos confirmam este agrupamento proposto juntamente com a espécie de referência, visto que diferem apenas em CBMA 294 que cresce em 10 % de NaCl e CBMA 295 que apresenta colônias lisas. A morfologia microscópica desses isolados reforça esta proposta, pelo fato de apresentarem um perfil cocobacilar e tendência a formar filamentos, dificultando a observação de microorganismos isolado dos demais.

5.2. Aspectos bioquímicos

As micobactérias secretam uma grande variedade de proteínas para o meio extracelular, apesar de terem um envelope celular espesso, hidrofóbico e muito resistente (DiGiuseppe Champion & Cox, 2007; Feltcher *et al.*, 2010). Como exemplo, 101 diferentes proteínas secretadas já foram identificadas no secretoma de BCG Moreau, representando 7 dos 11 grupos da classificação funcional proposta pelo BCGList (<http://genolist.pasteur.fr/BCGList/>): “Metabolismo intermediário e respiração” (35), “Parede celular e processos celulares” (23), “Hipotéticas conservadas” (17), “Vias de informação” (9), “Metabolismo de lipídio” (9), “Virulência,

detoxificação, adaptação” (7) e “Proteínas regulatórias” (1) (Berrêdo-Pinho *et al.*, 2011). Embora as análises proteômicas sejam realizadas por eletroforese bidimensional (2DE) e, recentemente, por eletroforese em gel diferencial bidimensional (2D-DIGE) ou espectrometria de massas de alta resolução (Berth *et al.*, 2007; Minden, 2007; Isaaq & Veenstra, 2008; Berrêdo-Pinho *et al.*, 2011; Weigoldt *et al.*, 2011), a verificação do perfil de secreção de proteínas descrita neste trabalho foi realizada por eletroforese unidimensional com o objetivo de fazer uma varredura inicial de cada isolado. Assim, o perfil de secreção de proteínas observado para cada isolado da CBMA é complexo, apresentando mínimas diferenças na variedade e um acúmulo de proteínas conforme o tempo de cultivo, refletindo o perfil das curvas de crescimento.

Segundo informações do Tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/>), *M. tuberculosis* H37Rv apresenta 28 genes que codificam para prováveis 28 diferentes proteases, entre elas serina proteases, metaloproteinases e endopeptidases. Em estudo comparativo entre os genomas de *M. leprae*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. avium paratuberculosis*, Ribeiro-Guimarães & Pessolani (2007) encontraram 38 genes que codificam para proteases, quatro dessas são provavelmente secretadas, compartilhadas entre essas quatro espécies, com uma homologia variando entre 63 % e 97 %. Esse grau de conservação entre as proteases dessas diferentes espécies sugere que as MNT também codifiquem diversas proteases. Berrêdo-Pinho e colaboradores (2011), em estudo sobre o perfil proteômico do filtrado de cultura de BCG Moreau, identificaram apenas uma protease: PepA, uma provável serina protease que acredita-se ser secretada, devido à presença de um peptídeo sinal (Skeiky *et al.*, 1999).

A atividade proteásica é classicamente avaliada por zimografia em gel de poliacrilamida utilizando-se gelatina como substrato (Quiding-Järbrink *et al.*, 2001; Sheen *et al.*, 2009), por isso foi utilizada esta técnica com o objetivo de verificar a presença de proteases nos isolados da CBMA. Esta atividade foi detectada apenas no lisado total (em todos os isolados), o que é esperado, visto que proteases são classicamente intracelulares ou de membrana. Contudo, esta atividade não foi tão expressiva, pois, segundo o teste bioquímico para gelatinase, apenas dois isolados (CBMA 293 e 326) apresentaram resultados positivos. Assim, é necessário realizar novos testes variando o pH e, principalmente o cofator. Quanto as amostras do

filtrado de cultura é necessário fazer uma nova preparação das amostras, concentrando-as a partir de outro método, visto que TCA é um agente altamente desnaturante (Wang *et al.*, 2008) e pode ter contribuído para inativação das proteases presentes nesta fração.

Celulose compõe cerca de metade da parede celular das plantas, sendo a fonte de carbono mais abundante do planeta (Lynd *et al.*, 2002). Embora a celulose seja naturalmente resistente à ação de microorganismos, algumas bactérias apresentam enzimas capazes de hidrolisá-la em glicose, tais como *Bacillus pumilis*, *Clostridium cellulolyticum* e *Streptomyces reticuli*, comumente encontradas no solo (Lynd *et al.*, 2002). Assim, a descoberta de um gene que codifica para uma celulase em *M. tuberculosis* foi inesperada, pois esta enzima não tem um papel óbvio nem no seu crescimento nem na sua sobrevivência no hospedeiro (Varrot *et al.*, 2005). Foram identificadas, no genoma de *M. tuberculosis*, duas celulases funcionais, Cel6 (ou CelA1, 40,0 kDa) e Cel12 (ou CelA2, 16,4 kDa), codificadas a partir dos genes *rv0062* e *rv1090*, que pertencem a duas famílias diferentes, GH6 e GH12, de acordo o banco de dados “Carbohydrate-Active EnZymes” (www.cazy.org), além de uma proteína que se liga a celulose (CBD2), codificada pelo gene *rv1987*, e o gene de uma provável β -glucosidade, codificada pelo gene *rv0186* (Varrot *et al.*, 2005, Medie *et al.*, 2010). Com o objetivo de verificar genes que codificam para celulases em outras micobactérias, Medie e colaboradores analisaram 21 genomas micobacterianos, entre eles 8 de MNTs. Todas as MNTs avaliadas apresentaram um gene para Cel6 (exceto *M. ulcerans*), nenhum para Cel12 e de zero a cinco para CBD2 (Medie *et al.*, 2010). Ao avaliarmos os isolados da CBMA, verificamos que todos expressam uma mesma celulase característica de BCG Pasteur (CelA1), devido a mesma massa molecular esperada, porém foi observado atividade, por zimografia, apenas nos isolados CBMA 271 e CBMA 326. Embora ainda seja desconhecida a função e origem dessas celulases em *M. tuberculosis*, sugere-se que sua existência seja devida a um ancestral originário do solo ou que *M. tuberculosis* possa ter outro nicho ambiental (Varrot *et al.*, 2005, Medie *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2012). No caso dos isolados da CBMA, o fato de terem sido isoladas do solo explica a expressão dessa enzima. Entretanto, estudos mais detalhados são necessários para melhor caracterizar esta atividade enzimática.

O estudo das celulasas nestes isolados merecem uma atenção especial, pois podem ajudar a elucidar a origem e função da celulase em *M. tuberculosis* e, principalmente, pelo seu potencial biotecnológico. Essas enzimas catalisam a hidrólise da celulose transformando-a em um açúcar solúvel e permitindo que seja assimilado pelas células (Bayer *et al.*, 1998). Elas têm sido usadas em diversos ramos da indústria tais como alimentos, cervejas e vinhos, alimentação de animais, fármacos, cosméticos, têxtil, papel, agricultura e pesquisas de modo geral (Bhat, 2000). No entanto, seu maior potencial de uso é para a produção de etanol de segunda geração (ou etanol celulósico). A teoria deste processo é bem conhecida, porém a hidrólise da celulose continua sendo um passo com um custo muito elevado inviabilizando a produção deste biocombustível (Arantes & Saddler, 2010; Jung *et al.*, 2012). Diversos tipos de celulasas já foram identificados, a partir de diversos microorganismos, todavia a busca por celulasas mais eficientes continua sendo fundamental para o aperfeiçoamento e estabelecimento deste processo (Jung *et al.*, 2012). Assim, uma celulase isolada de um microorganismo da Mata Atlântica pode ter um grande impacto não apenas econômico, mas também ambiental e social, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento nacional.

Os resultados obtidos com os perfis protéicos parecem confirmar o agrupamento filogenético proposto anteriormente, com base na sequência dos genes *rrs* e *hsp65* e nos aspectos microbiológicos. A análise comparativa entre os géis das proteínas obtidas do filtrado de cultura e do lisado total dos diferentes isolados apresentam perfis característicos a cada grupo. Contudo diferenças observadas em CBMA 226 em relação à CBMA 234 e 293 sugerem que esses isolados não pertençam à mesma espécie. Na zimografia para análise da atividade protease no lisado total CBMA 271 e 326 apresentam bandas próximas a 35 e 66 kDa, CBMA 226, 234 e 293, bandas ligeiramente abaixo de 66 kDa e CBMA 294 e 329, ligeiramente acima de 66 kDa. Nas análises de atividade celulásica, fica nítida a diferença dos Isolados CBMA 271 e 326 dos demais, visto que no *western blot* apresentam banda dupla próximo a 40 kDa e na zimografia em gel de poliacrilamida são as únicas a apresentarem atividade enzimática. Nenhuma comparação é possível de ser feita entre os isolados da CBMA e as espécies de referência com base nesses parâmetros devido a este estudo ser pioneiro nessa área.

5.3. Desenvolvimento de um sistema de expressão de proteínas heterólogas

5.3.1. Capacidade de transformação

As transformações bacterianas com DNA plasmidial muitas vezes são realizadas por eletroporação, onde as células são submetidas a pulsos elétricos que promovem a abertura de poros na membrana e permite a entrada de macromoléculas, como o DNA (Chang *et al.*, 1992; Gehl, 2003; Ichimura *et al.*, 2010; Nijland *et al.*, 2010; Hyde *et al.*, 2011; Plaut *et al.*, 2013). Em micobactérias esse processo é particularmente mais complexo, devido à estrutura de seu envelope celular, no entanto, continua sendo o mais eficiente processo de transformação e, portanto, o mais amplamente utilizado (Jacobs *et al.*, 1991, Parish & Brown, 2008). Essa técnica tem sido usada desde o final da década de 1980 na transformação de diferentes espécies micobacterianas, tais como *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. vaccae*, *M. phlei*, *M. fortuitum*, *M. aurum*, *M. intracellulare*, *M. parafortuitum*, *M. marinum*, *M. avium* e *M. smegmatis*, (Snapper *et al.*, 1990 Houssaini-Iraqi *et al.*, 1992; Hermans *et al.*, 1993; Garbe *et al.*, 1994; Qin *et al.*, 1994; Wards & Collins, 1996; Talaat & Trucksis, 2000; Lee *et al.*, 2002; Consaul & Pavelka Jr., 2004).

Verificou-se que a eficiência de transformação está intimamente relacionada com a espécie e o marcador de resistência utilizado. Diversos antibióticos têm sido utilizados como marcadores para micobactérias, tais como higromicina, gentamicina, estreptomicina e sulfonamida, no entanto o principal e mais utilizado é a canamicina, pois confere uma maior eficiência na transformação. Por isso, a escolha adequada do plasmídeo (vetor) é essencial. Vetores tipo ponte (*shuttle vectors*), capazes de se replicar em *E. coli* e em micobactérias, são amplamente utilizados, pois permitem uma maior facilidade na manipulação do DNA (Parish & Brown, 2008). Medeiros e colaboradores (2002), em estudo sobre a capacidade de transformação de *M. bovis* BCG, *M. smegmatis* mc²155 e *M. vaccae* com diferentes vetores, verificaram que a mesma espécie responde de maneira diferente a cada vetor devido não apenas ao marcador de resistência, mas também à estabilidade do vetor e ao grau de atividade do promotor. Nesse contexto o plasmídeo que se destacou foi o pUS989, com promotor *PAN*, pois apresentou a maior atividade promotora em BCG, mc²155 e *M.*

vaccae, e maior estabilidade em mc²155, sendo o vetor escolhido para este estudo. Este plasmídeo confere resistência ao antibiótico canamicina (para seleção dos transformantes) e possui a sequência codificante para a enzima beta-galactosidase de *E. coli* (*lacZ*) sob controle do promotor *PAN*. Assim, espera-se que bactérias transformadas produzam colônias de coloração azul em meio contendo canamicina e X-Gal.

Os resultados obtidos foram bastante diversificados, visto que cada isolado apresentou uma eficiência de transformação diferente e colônias brancas e azuis. Os isolados que apresentaram apenas colônias azuis (1) contêm o plasmídeo transferido, visto que cresceram em meio contendo canamicina, (2) reconhecem o promotor *PAN*, sendo capazes de expressar o gene *lacZ*, e produzir a enzima beta-galactosidase ativa, que confere a cor azul à bactéria transformada quando plaqueada em meio contendo o substrato X-Gal, e (3) preservaram a integridade e estabilidade do vetor, não apresentando mudanças estruturais (através de mecanismos como recombinação ou mutação pontual) que alterem as características descritas nos pontos 1 e 2, acima.

Nos isolados que apresentaram tanto colônias azuis quanto brancas, as brancas poderiam representar contaminantes (pouco provável, pois apresentam a mesma morfologia de colônia) ou transformantes portadores de plasmídeos que sofreram algum tipo de alteração (estrutural ou funcional). Embora o vetor pUS tenha se demonstrado bastante estável em *M. smegmatis* mc²155, houveram casos de modificações estruturais do plasmídeo e de perda da capacidade de expressar a β -galactosidase tanto em mc²155 quanto em *M. vaccae* (Medeiros *et al.*, 2002). Assim, é necessário averiguar se as colônias brancas são de fato do isolado que foi plaqueado e, em caso afirmativo, verificar a condição do plasmídeo. A presença do plasmídeo pode ser verificada por PCR e as alterações estruturais por sequenciamento de DNA ou mapeamento por digestão com enzimas de restrição do DNA plasmidial (Medeiros *et al.*, 2002), no caso de alterações drásticas como deleções de regiões maiores. É possível que o isolado tenha adquirido resistência a canamicina mesmo sem a presença do plasmídeo (também pouco provável), sendo necessário plaqueá-lo novamente em canamicina para confirmar esta hipótese.

Nos isolados que apresentaram apenas colônias brancas, depois de confirmada a identidade do isolado e a presença do plasmídeo, será necessário

verificar possíveis alterações estruturais no plasmídeo. Caso o plasmídeo permaneça íntegro, possivelmente o isolado não reconheça os sinais para expressão do gene ou não seja capaz de produzir atividade beta-galactosidásica.

Além de averiguar essas hipóteses é necessário repetir este experimento outras vezes de modo a garantir a sua reprodutibilidade.

5.3.2. Características gerais da cepa hospedeira

A tecnologia do DNA recombinante revolucionou a biologia molecular e os diversos ramos onde ela é aplicada. Por exemplo, desde 1982, quando a insulina recombinante foi aprovada, mais de 120 medicamentos e vacinas recombinantes foram aprovados pela Administração de Alimentos e Drogas (*Food and Drug Administration*, FDA) dos EUA e muitos outros estão em desenvolvimento. Então diversos sistemas de expressão foram desenvolvidos e alguns foram aprimorados visando garantir a qualidade da proteína e a eficácia, segurança e economia do processo de produção, no entanto, todo sistema apresenta vantagens e desvantagens (Gellissen, 2005; Arya *et al.*, 2008; Kamionka, 2011). Um sistema de expressão de proteínas heterólogas ideal teria baixo custo, alta densidade celular, capacidade de realizar modificações pós-traducionais, sem produção de toxinas ou proteases, simples e rápido, sem risco de infecção, estabilidade, sem expressão em corpos de inclusão (Arya *et al.*, 2008). Essas características direcionaram este estudo, onde avaliamos diversas condições visando o desenvolvimento de um sistema mais próximo do ideal.

A escolha de um isolado nacional reduz os gastos com importações e “direitos autorais”. As micobactérias foram escolhidas por serem capazes de realizar alguns tipos de modificações pós-traducionais visando um sistema de expressão onde as proteínas heterólogas produzidas sejam mais parecidas com a nativa. Outro ponto essencial é o fato das micobactérias secretarem grandes quantidades de proteínas, evitando a expressão em corpos de inclusão e facilitando sua purificação, e, conseqüentemente, tornando o processo mais simples e barato. Uma vantagem de o hospedeiro ter sido isolado do meio ambiente é o fato do risco de infecção ser mínimo, garantido segurança ao processo. A avaliação do perfil de crescimento possibilitou a seleção de isolados que atingissem uma alta densidade celular em um

curto período de tempo em condições de cultivo simples e comuns, contribuindo para expressão de grandes quantidades de proteínas em curto espaço de tempo a baixo custo. Foi avaliada também a secreção de proteases, que poderiam degradar a proteína expressa. Por último, foi avaliada a capacidade de esses isolados serem transformados por eletroporação, além da eficiência dessa transformação, pontos vitais para a seleção do hospedeiro deste novo sistema de expressão.

5.4. Relação MNT e vacina BCG

Wilson e colaboradores (1995) propuseram que a eficiência da vacina BCG varia com a latitude geográfica, sendo menor em regiões tropicais, tendo como causa mais provável o maior contato com MNT. Acredita-se que a exposição às MNT pode reduzir a eficiência da vacina BCG (Flaherty *et al.*, 2006) ou aumentar a proteção parcial contra infecção por *M. tuberculosis* dependendo de fatores como dose, espécie ou cepa (Young *et al.*, 2007). Desse modo, ainda permanece desconhecida como as MNT influenciam a eficácia da vacina BCG. Um mecanismo seria através da presença de antígenos comuns, compartilhados entre BCG e MNT, que poderiam proporcionar um efeito protetor cruzado, ou pela presença de antígenos em MNT, mas não em BCG, que poderiam produzir um efeito antagonista (Checley *et al.*, 2011). Por isso, foi avaliado se essas MNT nacionais apresentam antígenos compartilhados com a vacina nacional contra tuberculose. Os antígenos foram selecionados por serem específicos de BCG Moreau (Mpt64) ou classicamente imunogênicos (Mpt70, Mpt83 e Ag85) ou essenciais a *M. tuberculosis* (GlnA1 e HspX), já tendo sido alvo de estudos prévios do laboratório.

O complexo 85 é composto por três distintas trealose dimicolil transferases, Ag85A (35,7 kDa), Ag85B (34,6 kDa) e Ag85C (36,8 kDa), que estão envolvidas na deposição de micolato e na biosíntese tanto dos ácidos micólicos quanto da parede celular, sendo críticas para a construção da parede celular micobacteriana normal e crescimento celular (Belisle *et al.*, 1997), sendo esperado que todos os isolados apresentassem estes antígenos. São proteínas secretadas – por isso, sua expressão foi avaliada apenas no filtrado de cultura –, mas também ficam retidas na parede celular micobacteriana, sendo encontradas tanto nas micobactérias do complexo *M. tuberculosis* quanto nas não tuberculosas (Wiker & Harboe, 1992; Kuo

et al., 2012). Além disso, estas enzimas parecem constituir fatores importantes de patogênese, uma vez que atuam como proteínas de ligação de fibronectina (fbps) responsáveis pela ligação com o macrófago humano durante a fase inicial de infecção, sendo um provável fator de virulência (Wilkinson *et al.*, 2001). Os antígenos deste complexo estão sendo usados no desenvolvimento de diversas novas vacinas contra tuberculose, sendo o mais promissor para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade (Ottenhoff & Kaufmann, 2012).

Assim, embora quase todos os isolados tenham expressado e secretado os antígenos do complexo 85, a ausência de secreção pelo isolado CBMA 234 foi bastante inesperada. Por isso, foi feito um novo pedido deste isolado a CBMA/IOC, realizada sua confirmação genética pelos genes *rrs* e *hsp65*, extraídas as proteínas do filtrado de cultura nas mesmas condições e realizado um novo *western blot*. Este novo resultado confirmou a ausência de secreção deste antígeno, sendo esta a primeira micobactéria descrita a não secretar os antígenos do complexo 85. Deste modo é necessário verificar: 1) se esses antígenos são expressos, mas não são secretados, através, por exemplo, de *western blot* com amostra do lisado total; e 2) se este isolado possui os genes que codificam para esses antígenos e se estão íntegros, através de PCR ou *southern blot*.

Mpt64 (24,8 kDa) é um antígeno secretado com significativo poder imunogênico. Bai e colaboradores (2009) verificaram que Mpt64 recombinante expresso em *M. vaccae* induz a elevados níveis de resposta imune celular e humoral em camundongos, podendo ser usado como um candidato para novas vacinas contra tuberculose. Foi proposto também o seu uso como um dos antígenos que comporiam uma vacina de subunidades (Luo *et al.*, 2012). JW Chen e colaboradores (2012) propuseram o uso deste antígeno associado ao *M. avium paratuberculosis* atenuado para o desenvolvimento de vacinas contra a Doença de Johne, causada por esta micobactéria. No entanto, também foi proposto o uso de Mpt64 em um coquetel de antígenos para a prova tuberculínica, visto ser um antígeno específico do complexo *M. tuberculosis* (Stavri *et al.*, 2012). Por isso, o fato de não encontrarmos reatividade para este antígeno era esperado.

Mpt70 (19,1 kDa) é expressa em grandes quantidades por BCG Moreau, é muito estável ao calor e induz a resposta imune por IFN γ e TNF α diante de infecções micobacterianas, sendo indicada para compor vacinas de subunidades (Wiker,

2009). Tem apresentado resultados positivos para o tratamento da asma (Han *et al.*, 2012). Já foram encontrados ortólogos em diversas MNT, além dos membros do complexo *M. tuberculosis* (Woolford *et al.*, 1997; Veyrier *et al.*, 2008). Assim era esperado que algum isolado da CBMA apresentasse este antígeno. Embora descrita como uma proteína secretada (Harboe & Nagai, 1984; Wiker, 2009), o anticorpo policlonal utilizado reconheceu uma proteína do tamanho esperado apenas na fração do lisado total. O fato de apresentar a tendência a formar dímeros (Wiker, 2009), explica as marcações próximo a 20 e 40 kDa.

Mpt83 (22,1 kDa) é uma lipoglicoproteína de *M. tuberculosis*, que pode ser encontrado na superfície bacteriana e, tal como Mpt70, tende a formar dímeros e é estável ao calor (Wiker, 2009; Kao *et al.*, 2012). Diversos estudos comprovam a eficácia deste antígeno em induzir uma robusta resposta imune, indicando sua inclusão em coquetéis de vacinas de subunidades e apresentam este antígeno como mais imunogênico que Mpt70 (Wiker, 2009; Mustafa, 2011; ST Chen *et al.*, 2012; Kao *et al.*, 2012). Apesar de genes ortólogos serem identificados em outras micobactérias do complexo *M. tuberculosis* e MNT (Wiker, 2009), nenhum isolado da CBMA apresentou reatividade para este antígeno, tanto no filtrado de cultura quanto no lisado total (que inclui as proteínas de membrana). No entanto, pelo fato de não ser essencial para a sobrevivência dos isolados, essa ausência era esperada.

GlnA1 (53,5 kDa) é uma enzima essencial (glutamino sintetase) para o metabolismo de *M. tuberculosis* (Harth *et al.*, 2005; Hayward *et al.*, 2009), sendo também encontrada nas MNT (Harth *et al.*, 1994; Tullius *et al.*, 2001; Harth *et al.*, 2005; Baghel *et al.*, 2011) e em outras bactérias (Saum *et al.*, 2006). Apesar de ser uma das principais proteínas encontradas no filtrado de cultura de *M. tuberculosis* e BCG Moreau, mesmo não apresentando peptídeo sinal (Tullius *et al.*, 2001; Berrêdo-Pinho *et al.*, 2011), a presença deste antígeno foi verificada apenas no lisado total. Micobactérias patogênicas exportam grandes quantidades dessa proteína, enquanto que MNT exportam apenas pequenas quantidades (Harth *et al.*, 1994). No entanto, essas quantidades variam de 3 a 33% dos níveis totais expressos por essa enzima, onde a maioria é encontrada na fração intracelular (Raynaud *et al.*, 1998; Tullius *et al.*, 2001). Este não é considerado um bom antígeno para o desenvolvimento de vacinas contra tuberculose, pois não é específico. O fato de apenas cinco dos nove isolados avaliados apresentarem reatividade pode ser explicado pelo fato de

existirem outras glutamina sintetases, que poderiam estar sendo usadas por esses isolados, ou por ter não ter sido avaliado o filtrado de cultura, onde este antígeno pode estar em maiores concentrações.

HspX (16,2 kDa), ou alfa-cristalina, é um antígeno imuno dominante produzido por *M. tuberculosis* durante a fase de latência *in vivo* (Yuan *et al.*, 1996; de Souza *et al.*, 2011). É uma proteína encontrada principalmente na fração intracelular, segundo estudos em *M. tuberculosis* (Singhal *et al.*, 2012), mas, também, é secretada por BCG Moreau (Berrêdo-Pinho *et al.*, 2011). Tem sido estudada como antígeno para vacina de reforço contra tuberculose (N Taylor *et al.*, 2012) ou desenvolvimento de testes diagnósticos (Haldar *et al.*, 2012), além de ser um marcador da condição de hipóxia (Majumdar *et al.*, 2010). Assim, foi avaliada a presença deste antígeno apenas no filtrado de cultura, não sendo encontrado em nenhum dos isolados. Este resultado era esperado, pois nenhum trabalho tem descrito a presença desta proteína em MNT e os isolados da CBMA não foram crescidos em condição de hipóxia.

Por muitas décadas as MNT têm sido responsabilizadas pela ineficácia da vacina BCG. No entanto o não compartilhamento de diversos antígenos entre as MNT e BCG Moreau lança dúvidas sobre a real influência dessas micobactérias na vacinação contra tuberculose.

6. Conclusões

Os isolados da CBMA/IOC crescem melhor a 22 °C sob agitação.

Diante dos resultados de sequenciamento, análises filogenéticas, características microbiológicas e bioquímicas os nove isolados da CBMA estudados podem ser agrupados em quatro grupos diferentes: 1) CBMA 226, 2) CBMA 234 e 293, 3) CBMA 271 e 326, 4) CBMA 247, 294, 295 e 329.

A morfologia de colônia demonstrou variações ao longo das passagens.

Testes bioquímicos continuam sendo úteis na diferenciação de espécies, apesar de não ser mais a metodologia padrão para identificação de espécies.

A quantidade de proteínas secretada aumenta ao longo do crescimento da cultura, mas a diversidade de proteínas parece não variar conforme o tempo.

Atividade protease é observada em todos os isolados, sendo mais expressiva em CBMA 293 e 326.

Todos os isolados expressam a mesma celulase característica de BCG, CelA1, no entanto, os resultados indicam que apenas alguns apresentam esta enzima ativa.

Nenhum isolado expressa Mpt64 e Mpt83, tanto no lisado total quanto no filtrado de cultura, e Mpt70 e HspX no filtrado de cultura.

Todos os isolados expressam Mpt70 no lisado total e Ag85 no filtrado de cultura, exceto CBMA 234.

Todos os isolados são transformáveis, mas apresentam diferentes graus de eficiência. A maioria apresentou colônias azuis, indicando que reconhecem o promotor e expressam a proteína heteróloga.

Os principais candidatos para o desenvolvimento de um novo sistema de expressão de proteínas heterólogas são CBMA 226 (atinge alta DO_{600nm} em 7 dias, secreta grandes quantidades de proteínas, são transformáveis, reconhecem o promotor, preservam a integridade e estabilidade do vetor e apresentam alta eficiência de transformação) e CBMA 293 (atinge alta DO_{600nm} em 3 dias, secreta significativa quantidade de proteínas, são transformáveis, reconhecem o promotor, são pouco instáveis e apresentam eficiência média de transformação).

7. Bibliografia

- Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CM. Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* 2007 Nov; 5(11):883-91;
- Abou-Zeid C, Gares MP, Inwald J, Janssen R, Zhang Y, Young DB, Hetzel C, Lamb JR, Baldwin SL, Orme IM, Yermeev V, Nikonenko BV, Apt AS. Induction of a type-1 immune response to a recombinant antigen from *Mycobacterium tuberculosis* expressed in *Mycobacterium vaccae*. *Infect Immun* 1997, 65, 1856±1862;
- Adékambi T & Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, 54, 2095–2105;
- Adékambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M. rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, 56, 133-143;
- Agustí G, Astola O, Rodríguez-Güell E, Julián E, Luquin M. Surface spreading motility shown by a group of phylogenetically related, rapidly growing pigmented mycobacteria suggests that motility is a common property of mycobacterial species but is restricted to smooth colonies. *J Bacteriol* 2008; 190(20):6894-902;
- Ajello L, Georg LK, Kaplan W, Kaufman L. 1963. CDC laboratory manual for medical mycology. PHS Publication No. 994, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.;
- Al-Attayah R, Shaban FA, Wiker HG, Oftung F, Mustafa AS. Synthetic peptides identify promiscuous human Th1 cell epitopes of the secreted mycobacterial antigen MPB70. *Infect Immun*. 2003 Apr;71(4):1953-60;
- Alvarez E, Tavel E. Recherches sur le bacille de Lustgarten. *Arch Physiol Norm Pathol* 1885, 6:303-321;

- Andrejko M, Zdybicka-Barabas A, Janczarek M, Cytryńska M. Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles. *Acta Biochim Pol.* 2013;60(1):83-90;
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria no. 961, de 16 de julho de 2010. Institui o Grupo de Trabalho no âmbito da ANVISA com o objetivo de propor ações relativas ao seguimento de surtos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). *Diário Oficial da União* de 20/07/2010. p. 48. seção 2;
- ANVISA. Relatório descrito de investigação de casos de infecções por micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido (mcr) no brasil no período de 1998 a 2009. Fev 2011;
- Arantes V, Saddler JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels.* 2010 Feb 23;3:4;
- Arya R, Bhattacharya A, Saini KS. *Dictyostelium discoideum* – a promising expression system for the production of eukaryotic proteins. *FASEB J.* 2008 Dec;22(12):4055-66. Review;
- Aumiller JJ, Mabashi-Asazuma H, Hillar A, Shi X, Jarvis DL. A new glycoengineered insect cell line with an inducibly mammalianized protein N-glycosylation pathway. *Glycobiology.* 2012 Mar;22(3):417-28;
- Ausina V, Luquin M, Barcelo MG, Laneelle MA, Levy-Frebault V, Belda F, Prats AG. *Mycobacterium alvei* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, T. 1992, p. 529-535. Vol. 42, No. 4;
- Baghel AS, Tandon R, Gupta G, Kumar A, Sharma RK, Aggarwal N, Kathuria A, Saini NK, Bose M, Prasad AK, Sharma SK, Nath M, Parmar VS, Raj HG. Characterization of protein acyltransferase function of recombinant purified GlnA1 from *Mycobacterium tuberculosis*: a moon lighting property. *Microbiol Res.* 2011 Dec 20;166(8):662-72;
- Bai YL, Xue Y, Wang LM, Fan AL, Zhang W, Kang J, He JJ, Xu ZK. Immunoprophylaxis of recombinant *Mycobacterium vaccae* secreted MPT64 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2009 Mar;25(3):211-4;

- Baneyx F. Recombinant protein expression in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999; 10: 411–421;
- Barbosa MRV & Thomas WW. Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Mata Atlântica no Nordeste. In: Araújo EL, Moura NA, Sampaio ESB, Gestinari LMS, Carneiro JMT. Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil. Recife, Imprensa Universitária, p.19-22. 2002;
- Barrera L. The Basis of Clinical Bacteriology. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. Tuberculosis Textbook.com. 2007. p. 93-112. Disponível em: <<http://www.tuberculosistextbook.com/tuberculosis2007.pdf>>;
- Bayer EA, Chanzyt H, Lamed R, Shoham Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*, 1998, v. 8, p. 548-557;
- Belisle JT & Brennan PJ. Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J Bacteriol* 1989; 171:3465–3470;
- Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 1997; 276:1420–2;
- Benevolo-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; 100:459-65;
- Berrêdo-Pinho M, Kalume DE, Correa PR, Gomes LH, Pereira MP, da Silva RF, Castello-Branco LR, Degraive 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 Apr 20;11:80;
- Berth M, Moser FM, Kolbe M, Bernhardt J. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007 Oct;76(6):1223-43. Review;
- Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances.* 2000 v. 18, p. 355-383;

- Boddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blocker H, Bottger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1990; 28, 1751–1759;
- Brandon K, da Fonseca GAB, Rylands AB, da Silva JMC. Conservação brasileira: desafios e oportunidades. *Megadiversidade*. 2005 Jul; Vol 1, Nº 1;
- Brandt L, Feino Cunha J, Weinreich Olsen A, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, Andersen P. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun*. 2002 Feb;70(2):672-8;
- Brewer TF. Preventing tuberculosis with Bacillus Calmette-Guérin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis*. 2000 Sep;31 Suppl 3:S64-7;
- Brown CA, Brown IN, Swinburne S. The effect of oral *Mycobacterium vaccae* on subsequent responses of mice to BCG sensitization. *Tubercle* 1985, 66:251–260;
- Bruce T, Martinez IB, Neto OM, Vicente ACP, Kruger RH, Thompson FL. Bacterial community diversity in the brazilian Atlantic Forest soils. *Microb Ecol* 2010; 60:840–849;
- Buijtels PCAM, van der Sande MAB, de Graaff CS, Parkinson S, Verbrugh HA, Petit PLC, van Soolingen D. Nontuberculous mycobacteria, Zambia. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 15, No. 2, February 2009;
- Caldwell DR. *Microbial physiology and metabolism*. Wm. C. Brown Publishers, 1995, 55-59;
- Câmara IG. Breve história da conservação da Mata Atlântica. *SOS Mata Atlântica/Conservação Internacional do Brasil*. Belo Horizonte, 2005;
- Chang CT, Wang LY, Liao CY, Huang SP. Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol*. 2002; 68:3159–3161;
- Chang D, Chassy B, Saunders J, Sowers A. *Guide to Electroporation and Electrofusion*. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1992;
- Checkley AM, Wyllie DH, Scriba TJ, Golubchik T, Hill AV, Hanekom WA, McShane H. Identification of antigens specific to non-tuberculous mycobacteria: the Mce

- family of proteins as a target of T cell immune responses. PLoS One 2011; 6(10):26434;
- Chen JW, Faisal SM, Chandra S, McDonough SP, Moreira MA, Scaria J, Chang CF, Bannantine JP, Akey B, Chang YF. Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* attenuated mutants against challenge in a mouse model. Vaccine. 2012 Apr 19;30(19):3015-25;
- Chen ST, Li JY, Zhang Y, Gao X, Cai H. Recombinant MPT83 derived from *Mycobacterium tuberculosis* induces cytokine production and upregulates the function of mouse macrophages through TLR2. J Immunol. 2012 Jan 15;188(2):668-77;
- Chilima BZ, Clark IM, Floyd S, Fine PEM, Hirsch PR. Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District, northern Malawi. Appl Environ Microb, Apr. 2006, p. 2343–2350 Vol. 72, No. 4;
- Coimbra-Filho AF & Câmara IG. Os limites originais do bioma Mata Atlântica na região nordeste do Brasil. Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza (FBCN). Rio de Janeiro, 1996;
- Colditz,GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV. The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. Pediatrics 1995, 96, 29-35;
- Collins FM. Immunogenicity of various mycobacteria and the corresponding levels of cross-protection developed between species. Infect. Immun. 1971, 4:688–696;
- Consaul SA & Pavelka Jr. MS. Use of a novel allele of the *Escherichia coli* aacC4 aminoglycoside resistance gene as a genetic marker in mycobacteria. FEMS Microbiol Lett, 2004; 234, 297–301;
- Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN Jr. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. Appl Environ Microbiol. 1999 Jun;65(6):2492-6;
- Daffé M & Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. Adv Microb Physiol. 1998; 39:131-203. Review;

- Dai J, Chen Y, Dean S, Morris JG, Salfinger M, Johnson JA. Multiple-genome comparison reveals new loci for *Mycobacterium* species identification. *Journal Clin Microb*, Jan 2011(A), p. 144–153 Vol. 49, N^o. 1;
- Dai J, Chen Y, Lauzardo M. Web-Accessible Database of hsp65 sequences from *Mycobacterium* reference strains. *Journal Clin Microb*, Jun 2011 (B), p. 2296–2303 Vol. 49, N^o. 6;
- Davidson PT. 1981. International conference on atypical mycobacteria. *Rev. Infect. Dis.* 3:813–1103;
- Davidson PT. The diagnosis and management of disease caused by *M. avium* complex, *M. kansasii*, and other mycobacteria. *Clin. Chest. Med.*, 1989 10(3): 59-63;
- de Sousa EM, da Costa AC, Trentini MM, de Araújo Filho JA, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. Immunogenicity of a fusion protein containing immunodominant epitopes of Ag85C, MPT51, and HspX from *Mycobacterium tuberculosis* in mice and active TB infection. *PLoS One*. 2012;7(10):e47781;
- Delogu G, Bua A, Pusceddu C, Parra M, Fadda G, Brennan MJ, Zanetti S. Expression and purification of recombinant methylated HBHA in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Oct 1;239(1):33-9;
- DiGiuseppe Champion PA, Cox JS. Protein secretion systems in mycobacteria. *Cell Microbiol*. 2007 Jun;9(6):1376-84. Review;
- Dobner P, Feldmann K, Rifai M, Löscher T, Rinder H. Journal rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter region. *Of Clinical Microbiology*, Apr. 1996, p. 866–869 Vol. 34, No. 4;
- Doherty TM & Andersen P. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Oct;18(4):687-702;
- D'Urzo N, Martinelli M, Nenci C, Brettoni C, Telford JL, Maione D. High-level intracellular expression of heterologous proteins in *Brevibacillus choshinensis* SP3 under the control of a xylose inducible promoter. *Microb Cell Fact*. 2013 Feb 1;12:12;

- Edwards ML, Goodrich JM, Muller D, Pollack A, Ziegler JE, Smith DW. Infection with *Mycobacterium avium-intracellulare* and the protective effects of Bacille Calmette-Guerin. *J. Infect. Dis.* 1982, 145:733–741;
- Falcão DP, Valentini SR, Leite CQF. Pathogenic or potentially pathogenic bacteria as contaminants of fresh water from different sources in Araraquara, Brazil. *Water Resources*, 1993; 27(12): 1737-1741;
- Falkinham III JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; 9:177–215;
- Falkinham III JO. Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. *Emerging Infectious Diseases* – www.cdc.gov/eid – Vol. 17, N^o. 3, March 2011;
- Falkinham III JO. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin. Chest. Med.*, v.23, n.3, p. 529-551, 2002;
- Falkinham III JO. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol.* 2009 Aug;107(2):356-67;
- Feltcher ME, Sullivan JT, Braunstein M. Protein export systems of *Mycobacterium tuberculosis*: novel targets for drug development? *Future Microbiol.* 2010 Oct;5(10):1581-97. Review;
- Feuerriegel S, Köser C, Trübe L, Archer J, Gerdes SR, Richter E, Niemann S. Thr202Ala in thyA is a marker for the Latin American mediterranean lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex rather than para-aminosalicylic acid resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 November; 54(11):4794–4798;
- Flaherty DK, Vesosky B, Beamer GL, Stromberg P, Turner J. Exposure to *Mycobacterium avium* can modulate established immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection generated by *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *J Leukoc Biol* 2006; 80:1262–1271;
- Fundação SOS Mata Atlântica & INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995–2000. São Paulo, 2001;

- Fundação SOS Mata Atlântica & INPE. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período de 2005 a 2008. 2010 <<http://www.sosmatatlantica.org.br>>;
- Fundação SOS Mata Atlântica, INPE e Instituto Socioambiental. Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1990–1995. São Paulo, 1998;
- Galindo-Leal C & Câmara IG. Atlantic forest hotspots status: an overview. The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook. Center for Applied Biodiversity Science e Island Press. Washington pp. 3-11, 2003;
- Garbe TR, Barathi J, Barnini S, Zhang Y, Abou-Zeid C, Tang D, Mukherjee R, Young DB. Transformation of mycobacterial species using hygromycin resistance as selectable marker. *Microbiology*, 1994; 140, 133–138;
- Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand*. 2003 Apr;177(4):437-47;
- Gellissen, G. (ed) (2005). Front Matter, in Production of recombinant proteins: novel microbial and eukaryotic expression systems. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG;
- Ghosh J, Larsson P, Singh B, Pettersson BM, Islam NM, Sarkar SN, Dasgupta S, Kirsebom LA. Sporulation in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009, 106:10781–10786;
- Goldstone RM, Moreland NJ, Bashiri G, Baker EN, Shaun Lott J. A new Gateway vector and expression protocol for fast and efficient recombinant protein expression in *Mycobacterium smegmatis*. *Protein Expr Purif*. 2008 Jan;57(1):81-7. Epub 2007 Sep 14;
- Gomila M, Ramirez A, Gascó J, Lalucat J. *Mycobacterium llatzerense* sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008 Dec;58(Pt 12):2769-73;
- Gopinath K & Singh S. Non-tuberculous mycobacteria in TB-endemic countries: are we neglecting the danger? *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Apr 27;4(4):e615 Review;

- Gutierrez-Lugo MT, Newton GL, Fahey RC, Bewley CA. Cloning, expression and rapid purification of active recombinant mycothiol ligase as B1 immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G, glutathione-S-transferase and maltose binding protein fusion proteins in *Mycobacterium smegmatis*. *Protein Expr Purif.* 2006 Nov;50(1):128-36;
- Haldar S, Sankhyan N, Sharma N, Bansal A, Jain V, Gupta VK, Juneja M, Mishra D, Kapil A, Singh UB, Gulati S, Kalra V, Tyagi JS. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* GlcB or HspX antigens or devR DNA impacts the rapid diagnosis of tuberculous meningitis in children. *PLoS One.* 2012;7(9):e44630;
- Han ER, Choi IS, Choi HG, Kim HJ. Therapeutic effects of mycobacterial secretory proteins against established asthma in BALB/c mice. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2012 Jul;4(4):214-21;
- Hannigan GD, Krivogorsky B, Fordice D, Welch JB, Dahl JL. *Mycobacterium minnesotense* sp. nov., a photochromogenic bacterium isolated from sphagnum peat bogs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Jan;63(Pt 1):124-8;
- Harboe M & Nagai S. MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Am Rev Respir Dis.* 1984 Mar;129(3):444-52;
- Harth G, Clemens DL, Horwitz MA. Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 27;91(20):9342-6;
- Harth G, Maslesa-Galić S, Tullius MV, Horwitz MA. All four *Mycobacterium tuberculosis* glnA genes encode glutamine synthetase activities but only GlnA1 is abundantly expressed and essential for bacterial homeostasis. *Mol Microbiol.* 2005 Nov;58(4):1157-72;
- Hayward D, van Helden PD, Wiid IJ. Glutamine synthetase sequence evolution in the mycobacteria and their use as molecular markers for Actinobacteria speciation. *BMC Evol Biol.* 2009 Feb 26;9:48;
- He Z, De Buck J. Cell wall proteome analysis of *Mycobacterium smegmatis* strain MC2 155. *BMC Microbiol.* 2010 Apr 22;10:121;

- Hermans J, Suy IML, De Bont JAM. Transformation of Gram-positive microorganisms with the Gram-negative broad-host-range cosmid vector pJRD215. *FEMS Microbiol Lett*, 1993; 108, 201–204;
- Hogg GG, Schinsky MF, McNeil MM, Lasker BA, Silcox VA, Brown JM. Central line sepsis in a child due to a previously unidentified *Mycobacterium*. *J Clin Microbiol*. 1999 Apr;37(4):1193-6;
- Houssaini-Iraqi, M., Lazraq, M.H., Clavel-Seres, S., Rastogi, N. and David, H.L. (1992) Cloning and expression of *Mycobacterium aurum* carotenogenesis genes in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett*, 69, 239–244;
- Hunt I. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein Expr. Purif.* 2005; 40, 1–22;
- Hyde JA, Weening EH, Skare JT. Genetic transformation of *Borrelia burgdorferi*. *Curr Protoc Microbiol*. 2011 Feb;Chapter 12:Unit 12C.4;
- IBGE. Indicadores de desenvolvimento sustentável. Estudos e pesquisas, Informação geográfica, nº 2. Rio de Janeiro, 2002;
- IBGE. Indicadores de desenvolvimento sustentável. Estudos e pesquisas, Informação geográfica, nº 9. Rio de Janeiro, 2012;
- Ichimura M, Nakayama-Imaohji H, Wakimoto S, Morita H, Hayashi T, Kuwahara T. Efficient electrotransformation of *Bacteroides fragilis*. *Appl Environ Microbiol*. 2010 May;76(10):3325-32;
- Imperiale B, Zumárraga M, Gioffré A, Di Giulio B, Cataldi A, Morcillo N. Disease caused by non-tuberculous mycobacteria: diagnostic procedures and treatment evaluation in the North of Buenos Aires Province. *Rev Argent Microbiol*. 2012 Jan-Mar; 44(1):3-9;
- Issaq H & Veenstra T. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*. 2008 Apr;44(5):697-8;
- Jacobs WR Jr, Kalpana GV, Cirillo JD, Pascopella L, Snapper SB, Udani RA, Jones W, Barletta RG, Bloom BR. Genetic systems for mycobacteria. *Methods Enzymol*. 1991;204:537-55. Review;

- Janda JM & Abbott SL. Minireview. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 2007, p. 2761–2764 Vol. 45, No. 9;
- Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Stahl S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2002; 35, 91–105;
- Jordão Junior CM, Lopes FC, David S, Farache Filho A, Leite CQ. Detection of nontuberculous mycobacteria from water buffalo raw milk in Brazil. *Food Microbiol.* 2009 Sep;26(6):658-61. 2009 May 3;
- Jung SK, Parisutham V, Jeong SH, Lee SK. Heterologous expression of plant cell wall degrading enzymes for effective production of cellulosic biofuels. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:405842;
- Kamala T, Paramasivan CN, Herbert D, Venkatesan P, Prabhakar R. Immune response & modulation of immune response induced in the guinea-pigs by *Mycobacterium avium* complex (MAC) & *M. fortuitum* complex isolates from different sources in the South Indian BCG trial area. *Indian J. Med. Res.* 1996, 103:201–211;
- Kamionka M. Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011 Feb 1;12(2):268-74. Review;
- Kao FF, Mahmuda S, Pinto R, Triccas JA, West NP, Britton WJ. The secreted lipoprotein, MPT83, of *Mycobacterium tuberculosis* is recognized during human tuberculosis and stimulates protective immunity in mice. *PLoS One.* 2012;7(5):e34991;
- Kaur D, Guerin ME, Škovierová H, Brennan PJ, Jackson M. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Appl Microbiol.* 2009 ; 69: 23–78;
- Kawai S, Hashimoto W, Murata K. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioeng Bugs.* 2010 Nov-Dec;1(6):395-403;

- Kazda J, Stackebrandt E, Smida J, Minnikin DE, Daffe M, Parlett JH, Pitulle C. *Mycobacterium cookii* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 1990, 40, 217-223;
- Korpole S, Sharma R, Verma D. Characterization and phylogenetic diversity of carboxymethyl cellulase producing bacillus species from a landfill ecosystem. Indian J Microbiol. 2011 Oct;51(4):531-5;
- Kriss AE, Mitskevich IN, Rozanova EP, Osnitskaia LK. Microbiological studies of the Wanda Lake (Antarctica). Mikrobiologija. 1976 Nov-Dec;45(6):1075-81;
- Kumar A, Majid M, Kunisch R, Rani PS, Qureshi IA, Lewin A, Hasnain SE, Ahmed N. *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon gene Rv0079 encodes a putative, dormancy associated translation inhibitor (DATIN). PLoS One. 2012;7(6):e38709;
- Kuo CJ, Bell H, Hsieh CL, Ptak CP, Chang YF. Novel mycobacteria antigen 85 complex binding motif on fibronectin. J Biol Chem. 2012 Jan 13;287(3):1892-902.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970 Aug; 227(5259):680-5;
- Lazraq R, Clavel-Seres S, David HL. Transformation of distinct mycobacterial species by shuttle vectors derived from the *Mycobacterium fortuitum* pAL5000 plasmid. Curr Microbiol 1991; 22, 9±13;
- Leão SC, Matsumoto CK, Carneiro A, Ramos RT, Nogueira CL, Lima Junior JD, Lima KV, Lopes ML, Schneider H, Azevedo VA, da Silva AC. The detection and sequencing of a broad-host-range conjugative IncP-1 β plasmid in an epidemic strain of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*. PLoS One. 2013; 8(4): e60746;
- Leão SC, Tortoli E, Viana-Niero C, Ueki SYM, Lima KVB, Lopes ML, Yubero J, Menendez MC, Garcia MJ. Characterization of mycobacteria from a major brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae*-*M. abscessus* group is needed. Journal Clin Microb, Sept. 2009, p. 2691–2698 Vol. 47, No. 9;

- Learn-Han L, Yoke-Kqueen C, Shiran MS, Vui-Ling CM, Nurul-Syakima AM, Son R, Andrade HM. Identification of actinomycete communities in Antarctic soil from Barrientos Island using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Genet Mol Res.* 2012 Feb 8;11(1):277-91;
- Lee SH, Cheung M, Irani V, Carroll JD, Inamine JM, Howe WR, Maslow JN. Optimization of electroporation conditions for *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2002; 82, 167–174;
- Lewinsohn TM & Prado PI. Quantas espécies há no Brasil? *Megadiversidade* 2005 Jul; vol 1 N° 1;
- Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum Vaccin.* 2009 Feb;5(2):70-8;
- Luo Y, Jiang W, Da Z, Wang B, Hu L, Zhang Y, An R, Yu H, Sun H, Tang K, Tang Z, Wang Y, Jing T, Zhu B. Subunit vaccine candidate AMM down-regulated the regulatory T cells and enhanced the protective immunity of BCG on a suitable schedule. *Scand J Immunol.* 2012 Mar;75(3):293-300;
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. & Pretorius, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol* 2002 Rev 66, 506–577;
- MacFaddin JF. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria. vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore;
- Majumdar SD, Sharma D, Vashist A, Kaur K, Taneja NK, Chauhan S, Challu VK, Ramanathan VD, Balasangameshwara V, Kumar P, Tyagi JS. Co-expression of DevR and DevR(N)-Aph proteins is associated with hypoxic adaptation defect and virulence attenuation of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* 2010 Feb 26;5(2):e9448;
- Mantovani W. A degradação dos biomas brasileiros. Patrimônio ambiental brasileiro. Universidade de São Paulo. São Paulo, pp. 367-439, 2003;
- Marras TK, Chedore P, Ying AM, Jamieson F. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997–2003. *Thorax.* 2007;62:661–6;

- Martín-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J, Thomsen VO, Curcio M, Fauville-Dufaux M, Feldman K, Havelkova M, Katila ML, Köksalan K, Pereira MF, Rodrigues F, Pfyffer GE, Portaels F, Urgell JR, Rüsç-Gerdes S, Tortoli E, Vincent V, Watt B; Spanish Group for Non-Tuberculosis Mycobacteria. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004 Oct;8(10):1186-93.
- Matlock RC, Beringer RW, Ash DL, Page AF, Allen MW. Differences in bacterial optical density measurements between spectrophotometers. Technical note 52236, Thermo Fisher Scientific, 2011;
- Matos ED, Santana MA, de Santana MC, Mamede P, Bezerra BL, Panão ED, Schitini Filho CS, Lemos ACM. Nontuberculosis mycobacteria at a multiresistant tuberculosis reference center in Bahia: Clinical Epidemiological Aspects. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2004; 8(4):296-304;
- Medeiros MA, Dellagostin OA, Armôa GR, Degrave WM, De Mendonça-Lima L, Lopes MQ, Costa JF, McFadden J, McIntosh D. Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. *Microbiology*. 2002 Jul;148(Pt 7):1999-2009;
- Medie FM, Salah IB, Drancourt M, Henrissat B. Microbiology. Paradoxical conservation of a set of three cellulose-targeting genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Microbiol* 2010 May;156(Pt 5):1468-75;
- Merle CS, Cunha SS, Rodrigues LC. BCG vaccination and leprosy protection: review of current evidence and status of BCG in leprosy control. *Expert Rev Vaccines*. 2010 Feb;9(2):209-22;
- Miller. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y;
- Minden J. Comparative proteomics and difference gel electrophoresis. *Biotechniques*. 2007 Dec;43(6):739, 741, 743 passim. Review;
- Mittermeier RA, Robles-Gil P, Mittermeier CG (eds.). Megadiversity: Earth's biologically wealthiest nations. CEMEX, Agrupación Serra Madre, S.C., Mexico. 1997;

- Miyake R, Kawamoto J, Wei YL, Kitagawa M, Kato I, Kurihara T, Esaki N. Construction of a low-temperature protein expression system using a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. strain Ac10, as the host. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Aug;73(15):4849-56;
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). Cartilha do Pesquisador do Parque Nacional Serra dos Órgãos. Setor de Pesquisa Parque Nacional Serra dos Órgãos. 2007 Fev;
- MMA. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Fundação Biodiversitas. Brasília, vol 1, 1ª ed, 2008;
- Montenegro M. A Amazônia Azul – as riquezas naturais sob as águas do Atlântico. Rádio Câmara, Brasília, 7 set 2009. Link: [http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/radio/materias/REPORTAGEM-ESPECIAL/373057-AMAZ%C3%94NIA-AZUL--AS-RIQUEZAS-NATURAIS-SOB-AS-%C3%81GUAS-DO-ATL%C3%82NTICO-\(05'51%22\).html](http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/radio/materias/REPORTAGEM-ESPECIAL/373057-AMAZ%C3%94NIA-AZUL--AS-RIQUEZAS-NATURAIS-SOB-AS-%C3%81GUAS-DO-ATL%C3%82NTICO-(05'51%22).html);
- Motta & Bona MG, Leal MJS, Martins LMS, da Silva RN, de Castro JAF, do Monte SJH Análise de restrição enzimática do gene hsp65 de isolados clínicos de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar em Teresina, Piauí. *J Bras Pneumol.* 2011;37(5):628-635;
- MS (Ministério da Saúde). Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Hélio Fraga. Manual de bacteriologia da tuberculose. Rio de Janeiro, 3ª ed, 240 p., 2005;
- Murray A, Winter N, Lagranderie M, Hill DF, Rauzier J, Timm J, Leclerc C, Moriarty KM, Gheorghiu M, Gicquel B. Expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses. *Mol Microbiol.* 1992 Nov;6(22):3331-42;
- Mustafa AS. Comparative evaluation of MPT83 (Rv2873) for T helper-1 cell reactivity and identification of HLA-promiscuous peptides in *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated healthy subjects. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 Oct;18(10):1752-9;
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000, 403:853-845;

- Niederweis M, Danilchanka O, Huff J, Hoffmann C, Engelhardt H. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol.* 2010; 18(3): 109–116;
- Nijland R, Burgess JG, Errington J, Veening JW. Transformation of environmental *Bacillus subtilis* isolates by transiently inducing genetic competence. *PLoS One.* 2010 Mar 16;5(3):e9724;
- Noens EE, Williams C, Anandhakrishnan M, Poulsen C, Ehebauer MT, Wilmanns M. Improved mycobacterial protein production using a *Mycobacterium smegmatis* groEL1ΔC expression strain. *BMC Biotechnol.* 2011; 11:27;
- Norby B, Fosgate GT, Manning EJB, Collins MT, Roussel AJ. Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: Association between presence of cultivable micobactéria and soil and water physicochemical characteristics. *Veterinary Microbiology* 124, 2007, 153–159;
- Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, Haslov K, Andersen P. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber Lung Dis* 1999; 79:243-50;
- Oliveira Filho AT & Fontes, MAL. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 2000; 32:793-810;
- Orme IM, Roberts AR, Collins FM. Lack of evidence for a reduction in the efficacy of subcutaneous BCG vaccination in mice infected with nontuberculous mycobacteria. *Tubercle* 1986, 67:41–46;
- Ottenhoff TH & Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog.* 2012;8(5);
- Palmer CE & Long MW. Effects of infection with atypical mycobacteria on BCG vaccination and tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1966 Oct;94(4):553-68.
- Parish T & Brown AC. *Mycobacteria protocols*. Second edition. *Methods in molecular Biology* 465. Humana Press, 2008;

- Pasqualotto AC, Rosa DD, Fontoura Pereira Mdo C, Targa-Ferreira RL, Santos BR. Retrospective study of 668 cultures for mycobacteria in a reference hospital for AIDS in southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2003 Apr;7(2):126-8;
- Plaut RD, Mocca CP, Prabhakara R, Merkel TJ, Stibitz S. Stably luminescent *Staphylococcus aureus* clinical strains for use in bioluminescent imaging. *PLoS One*. 2013;8(3):e59232;
- Primm TP, Christie A, Lucero, and Falkinham III JO. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clin Microb Reviews*, Jan. 2004, p. 98–106. Vol. 17, No. 1;
- Qin M, Taniguchi H, Mizuguchi Y. Analysis of the replication region of a mycobacterial plasmid, pMSC262. *J Bacteriol*, 1994; 176, 419–425;
- Quiding-Järbrink M, Smith DA, Bancroft GJ. Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. *Infect Immun*. 2001 Sep;69(9):5661-70;
- Rangel L. O que resta da mata atlântica. *Ciência Hoje*, 27 mai 2010. Link: <http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/2010/05/o-que-resta-da-mata-atlantica>
- Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech*. 2001 Apr; 20(1):21-54. Review;
- Raynaud C, Etienne G, Peyron P, Laneelle MA, Daffe M. Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 1998, 144:577–587.
- RBMA (Reserva da Biosfera da Mata Atlântica). Roteiro para o entendimento de seus objetivos e seu Sistema de Gestão. Série Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Caderno nº 2. 2ª ed, 1996;
- Restrepo AV, Salem JI, Ogusku MM, Gomes LF, Fraiji NA. Pesquisa de Micobactérias Ambientais em água de torneira, luvas e soluções utilizadas em procedimentos cirúrgicos no Hospital Universitário Getúlio Vargas - Manaus/AM. *Acta Amazonica*. vol. 39(4) 2009: 889 – 900;
- Resultado Edital FAPERJ 16/12/2010.
http://www.faperj.br/interna.phtml?obj_id=6886
- Ribeiro-Guimarães ML, Pessolani MC. Comparative genomics of mycobacterial proteases. *Microb Pathog*. 2007 Nov-Dec;43(5-6):173-8.

- Roche PW, Feng CG, Britton WJ. Human T-cell epitopes on the *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein MPT64, *Scand. J Immunol* 1996; 43:662–670.
- Rogall T, Wolters J, Flohr T, Bottger EC. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Intern Journal of System Bacteriol*, 1990, p. 323-330. Vol. 40, No. 4;
- Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. North Am.* 1959 43:273–290;
- Sabater J, Yscla A, Obenich J. *Mycobacterium valentiae* sp. nov., a new species of the genus *Mycobacterium* isolated from soil. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1978;22(3):312-8;
- Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing Bio/Technology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* 2008; 307, 249–264;
- Saini V, Raghuvanshi S, Talwar GP, Ahmed N, Khurana JP, Hasnain SE, Tyagi AK, Tyagi AK. Polyphasic taxonomic analysis establishes *Mycobacterium indicus pranii* as a distinct species. *PLoS One.* 2009 Jul 16;4(7):e6263;
- Saum SH, Sydow JF, Palm P, Pfeiffer F, Oesterhelt D, Müller V. Biochemical and molecular characterization of the biosynthesis of glutamine and glutamate, two major compatible solutes in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *J Bacteriol.* 2006 Oct;188(19):6808-15;
- Schinsky MF, McNeil MM, Whitney AM, Steigerwalt AG, Lasker BA, Floyd MM, Hogg GG, Brenner DJ, Brown JM. *Mycobacterium septicum* sp. nov., a new rapidly growing species associated with catheter-related bacteraemia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000 Mar;50 Pt 2:575-81.
- Senna SG, Marsico AG, Vieira GBO, Sobral LF, Suffys PN, Fonseca LS. Identificação de micobactérias não tuberculosas isoladas de sítios estéreis em pacientes em um hospital universitário na cidade do Rio de Janeiro. *J Bras Pneumol.* 2011;37(4):521-526;
- Sheen P, O'Kane CM, Chaudhary K, Tovar M, Santillan C, Sosa J, Caviedes L, Gilman RH, Stamp G, Friedland JS. High MMP-9 activity characterises pleural

- tuberculosis correlating with granuloma formation. *Eur Respir J*. 2009 Jan;33(1):134-41;
- Shinnick TM. The 65-Kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Of Bacteriology*, Mar. 1987, P. 1080-1088. Vol. 169, No. 3;
- Shojaei H, Daley C, Gitti Z, Hashemi A, Heidarieh P, Moore ER, Naser AD, Russo C, van Ingen J, Tortoli E. *Mycobacterium iranicum* sp. nov., a rapidly growing scotochromogenic species isolated from clinical specimens on three different continents. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013 Apr;63(Pt 4):1383-9;
- Shojaei H, Heidarieh P, Hashemi A, Feizabadi MM, Naser AD. Species identification of neglected nontuberculous mycobacteria in a developing country. *Jpn J Infect Dis*, 2011; 64, 265-271;
- Singhal N, Sharma P, Kumar M, Joshi B, Bisht D. Analysis of intracellular expressed proteins of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Proteome Science* 2012, 10:14;
- Site da Coleção de Bactérias da Mata Atlântica (CBMA): <<http://cbma.fiocruz.br/index>>
- Site da Fundação Atauípho de Paiva (FAP): <<http://www.bcgfap.com.br/web/bcg/>>;
- Site do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO): <http://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos/>
- Site do Tuberculist: <<http://tuberculist.epfl.ch/>>;
- Skeiky YA, Lodes MJ, Guderian JA, Mohamath R, Bement T, Alderson MR, Reed SG. Cloning, expression, and immunological evaluation of two putative secreted serine protease antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun*. 1999; 67:3998–4007;
- Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* 1983; 3:2156–2165;
- Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, Jacobs WR Jr. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol*. 1990 Nov;4(11):1911-9;

- Sompolinsky D, Lagziel A, Rosenberg I. Further studies of a new pathogenic mycobacterium (*M. haemophilum* sp. nov.). *Can J Microbiol.* 1979 Feb;25(2):217-26;
- Springer B, Böttger EC, Kirschner P, Wallace RJ Jr. Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1995 Apr;45(2):262-7;
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:9869–9874;
- Stanford JL, Shield MJ, Rook GA. How environmental mycobacteria may predetermine the protective efficacy of BCG. *Tubercle.* 1981 Mar;62(1):55-62.
- Stavri H, Bucurenci N, Ulea I, Costache A, Popa L, Popa MI. Use of recombinant purified protein derivative (PPD) antigens as specific skin test for tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2012 November; 136(5): 799–807;
- Stephanou NC, Gao F, Bongiorno P, Ehrt S, Schnappinger D, Shuman S, Glickman MS. Mycobacterial nonhomologous end joining mediates mutagenic repair of chromosomal double-strand DNA breaks. *J Bacteriol.* 2007 Jul;189(14):5237-46. Epub 2007 May 11.
- Talaat AM & Trucksis M. Transformation and transposition of the genome of *Mycobacterium marinum*. *Am J Vet Res*, 2000; 61, 125–128;
- Tamura K & Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 1993; 10:512-526;
- Taylor JL, Wiczorek A, Keyser AR, Grover A, Flinkstrom R, Karls RK, Bielefeldt-Ohmann H, Dobos KM, Izzo AA. HspX-mediated protection against tuberculosis depends on its chaperoning of a mycobacterial molecule. *Immunol Cell Biol.* 2012 Nov;90(10):945-54;

- Taylor N, Bahunde F, Thompson A, Yu JS, Jacobs WR Jr, Letvin NL, Haynes BF, Lee S. Enhanced priming of adaptive immunity by *Mycobacterium smegmatis* mutants with high-level protein secretion. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 Sep;19(9):1416-25;
- Teather RM & Wood PJ. Use of Congo red–polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Appl Environ Microbiol.* 1982;43:777–780;
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal Clin Microb,* Feb. 1993, p. 175-178. Vol. 31, No. 2.
- Terpe, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002; 60, 523–533;
- Thom M, Howard C, Villarreal-Ramos B, Mead E, Vordermeier M, Hope J. Consequence of prior exposure to environmental mycobacteria on BCG vaccination and diagnosis of tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb).* 2008 Jul;88(4):324-34;
- Thomson RM, Carter R, Tolson C, Coulter C, Huygens F, Hargreaves M. Factors associated with the isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from a large municipal water sys in Brisbane, Australia. *BMC Microbiol.* 2013, 13:89;
- Toney N, Adekambi T, Toney S, Yakrus M, Butler WR. Revival and emended description of “*Mycobacterium paraffinicum*” Davis, Chase and Raymond 1956 as *Mycobacterium paraffinicum* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,* 2010, 60, 2307-2313.
- Torkko P, Suomalainen S, Iivanainen E, Suutari M, Tortoli E, Paulin L, Katila ML. *Mycobacterium xenopi* and related organisms isolated from stream waters in Finland and description of *Mycobacterium botniense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,* 2000, 50, 283-289.
- Torres LC & Ferreira HS. Amazônia Azul: a fronteira brasileira no mar. *Revista Passadiço, Centro de Adestramento Almirante Marques de Leão – CAAML, Rio de Janeiro,* p. 3-5, 2005;

- Tortoli E, Gitti Z, Klenk HP, Lauria S, Mannino R, Mantegani P, Mariottini A, Neonakis I. Survey of 150 strains belonging to the *Mycobacterium terrae* complex and description of *Mycobacterium engbaekii* sp. nov., *Mycobacterium heraklionense* sp. nov. and *Mycobacterium longobardum* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2013 Feb;63(Pt 2):401-11;
- Tortoli E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. Clin Microbiol Infect 2009; 15: 906–910;
- Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microb Reviews, Apr. 2003, p. 319–354 Vol. 16, No. 2;
- Tortoli E. The new mycobacteria: an update. FEMS Immunol Med Microbiol 2006, 48:159–178;
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology; 8.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 894p;
- Torvinen E, Torkko P, Nevalainen A, Rintala H. Real-time PCR detection of environmental mycobacteria in house dust. J. Microbiol. Methods 2010;
- Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. Infectious Disease Epidemiology Unit, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. 2006;
- Tullius MV, Harth G, Horwitz MA. High extracellular levels of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase and superoxide dismutase in actively growing cultures are due to high expression and extracellular stability rather than to a protein-specific export mechanism. Infect Immun. 2001 Oct;69(10):6348-63.
- Varrot A, Leydier S, Pell G, Macdonald JM, Stick RV, Henrissat B, Gilbert HJ, Davies GJ. *Mycobacterium tuberculosis* strains possess functional cellulases. J Biol Chem. 2005 May 27;280(21):20181-4;

- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen W. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007 Set 71(3): 495–548.
- Veyrier F, Saïd-Salim B, Behr MA. Evolution of the mycobacterial SigK regulon. *J Bacteriol.* 2008 Mar;190(6):1891-9;
- Viehman JA, Khalil D, Barhoma C, Hanna RM. *Mycobacterium avium-intracellulare* otomastoiditis in a young AIDS patient: case report and review of the literature. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care* 2013;5 61–66;
- Vlasenko EY, Ryan AI, Shoemaker CF, Shoemaker SP. The use of capillary viscometry, reducing end-group analysis, and size exclusion chromatography combined with multi-angle laser light scattering to characterize endo-1,4-beta-D-glucanases on carboxymethylcellulose: a comparative evaluation of the three methods. *Enzyme Microbial Technol* 1998, 23:350-359;
- Wang W, Tai F, Chen S. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics. *J Sep Sci.* 2008;31(11):2032–2039;
- Wards BJ & Collins DM. Electroporation at elevated temperatures substantially improves transformation efficiency of slow-growing mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 1996; 145, 101–105;
- Wayne LG & Sramek HA. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 1992, p. 1-25 Vol. 5, N^o. 1;
- Weigoldt M, Meens J, Doll K, Fritsch I, Möbius P, Goethe R, Gerlach GF. Differential proteome analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* grown in vitro and isolated from cases of clinical Johne's disease. *Microbiology.* 2011 Feb;157(Pt 2):557-65;
- Weiszfeiler JG & Karasseva V. Mixed mycobacterial infections. *Rev Infect Dis.* 1981 Sep-Oct;3(5):1081-3;
- Whipps CM, Butler WR, Pourahmad F, Watral VG, Kent ML. Molecular systematics support the revival of *Mycobacterium salmoniphilum* (ex Ross 1960) sp. nov.,

- nom. rev., a species closely related to *Mycobacterium chelonae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007, 57, 2525-2531.
- Wiker HG & Harboe M. The antigen 85 complex. A major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiol. Rev. 1992; 56, 648–661
- Wiker HG. MPB70 and MPB83 – Major antigens of *Mycobacterium bovis*. Scandinavian Journal of Immunology 2009; 69:492-499;
- Wilkinson RJ, DesJardin LE, Islam N, Gibson BM, Kanost RA, Wilkinson KA, Poelman D, Eisenach KD, Toossi Z. An increase in expression of a *Mycobacterium tuberculosis* mycolyl transferase gene (*fbpB*) occurs early after infection of human monocytes. Mol Microbiol. 2001 Feb;39(3):813-21;
- Willians & Wilkins. Bergey's – Manual of systematic bacteriology. 9^a ed. Baltimore, v. 2, p. 1436-1438, 1986;
- Wilson ME, Fineberg HV, Colditz GA. Geographic latitude and the efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccine. Clin Infect Dis 1995; 20:982–991.
- Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. Am Rev Respir Dis 1979; 119:107–159.
- Woolford AJ, Hewinson RG, Woodward M, Dale JW. Sequence heterogeneity of an *mpb70* gene analogue in *Mycobacterium kansasii*. FEMS Microbiol Lett. 1997 Mar 1;148(1):43-8;
- World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2012;
- WWF-Brasil. Mapa Bioma Mata Atlântica. <http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biomas/bioma_mata_atl/mapa_mata_atlantica/>;
- Young SL, Slobbe L, Wilson R, Buddle BM, de Lisle GW, Buchan GS. Environmental strains of *Mycobacterium avium* interfere with immune responses associated with *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. Infect Immun. 2007 Jun;75(6):2833-40
- Yuan Y, Crane DD, Barry CE. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. J Bacteriol 1996; 178: 4484–4492;

- Zakowski P, Fligiel S, Berlin DW, Johnson Jr L.. Disseminated *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency. JAMA 1982; 248:2980–2982;
- Zamarioli LA, Coelho AGV, Pereira CM, Nascimento ACC, Ueki SYM, Chimara E. Estudo descritivo da frequência de micobactérias não tuberculosas na Baixada Santista (SP). J Bras Pneumol. 2008;34(8):590-594;
- Zimbro MJ, Power DA, Miller SM, Wilson GE, Johnson JA. Difco™ & BBL™ Manual. Manual of Microbiological Culture Media. 2ª ed, 2009. BD Diagnostics – Diagnostic Systems. Sparks, Maryland, USA.

8. Anexos

Anexo I – Materiais

8.1. Meios de cultivo para os isolados micobacterianos

Tabela 8.1: Meio TSB (caldo triptona de soja)

TSB (HiMedia)	30 g
H ₂ O Milli-Q	q.s.p. 1000mL

Esterilização por autoclavação: 15 minutos a 121 °C

Tabela 8.2: Meio de cultura 7H9 contendo Tween 80 e glicerol

Middlebrook 7H9 Broth (Difco™)	4,7 g
Tween 80	0,05% (v/v)
Glicerol	0,2% (v/v)
H ₂ O Milli-Q	qsp. 900 mL

Esterilização por autoclavação: 15 minutos a 121 °C

Tabela 8.3: Solução de ADC (albumina, dextrose e catalase)

Albumina fração V	50,0 g
Catalase	0,03 g
Dextrose	20,0 g
H ₂ O Milli-Q	qsp. 1000 mL

A solução foi filtrada em membrana de PVDF de 0,22µm.

Tabela 8.4: Meio LB (Luria-Bertani)

Bacto-triptona (Difco)	10,0 g/L
Extrato de levedura (Difco)	5,0 g/L
NaCl (Merck)	10,0 g/L
pH (ajustado com NaOH 10N)	7,2

Esterilização por autoclavação: 15 minutos a 121 °C

Tabela 8.5: Meio Sauton

L-asparagina	4,0 g
Ácido Cítrico	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,5 g
Citrato Férrico Amoniacal	50 mg
Zn ₂ SO ₄	5,0 mM
Glicerol	60 mL
H ₂ O Milli-RO	qsp 1000mL
pH (ajustado com NaOH 10N)	7,2

Esterilização por autoclavação: 15 minutos a 121 °C

8.2. Coloração de Zielh-Neelsen

Tabela 8.6: Solução de fucsina fenicada

Fucsina básica	3,0 g
Etanol 95% PA	100 mL
Fenol aquoso*	55 mL
H ₂ O	qsp 1000 mL

A solução foi filtrada em papel filtro.

* 1.000 g de fenol cristalizado solubilizado em 100 mL de H₂O destilada.

Tabela 8.7: Solução descorante

Etanol 95% PA	970 mL
Ácido clorídrico PA	30 mL

Tabela 8.8: Solução de azul de metileno

Etanol 95% PA	100 mL
Azul de metileno	1,0 g
H ₂ O	qsp 1000 mL

8.3. Testes bioquímicos

Todos os meios de cultura utilizados foram autoclavados a 121 °C durante 20 minutos.

Tabela 8.9: Meio para teste de redução do nitrato

Peptona de carne	5,0
Extrato de carne	3,0 g
KNO ₃	1,0 g
H ₂ O	qsp. 1000mL
pH (ajustado com NaOH 10N)	7,0

Tabela 8.10: Meio Christensen

Extrato de levedura	0,5 g
Citrato de sódio	3,8 g
Glicose	0,2 g
Cloreto de L(+)-cisteína	0,1 g
Fosfato de Potássio Dibásico	1,0 g
NaCl	5,0 g
Vermelho de Fenol	20 mg
Ágar-ágar	12 g
H ₂ O	qsp 1000 mL
pH (ajustado com NaOH 10N)	6,8

Tabela 8.11: Meio caldo glicosado

Proteose peptona	0,7 %
Glicose – D(+) Dextrose	0,5 %
NaCl	0,5 %
pH (ajustado com NaOH 10N)	6,5

Tabela 8.12: Meio para teste de anaerobiose

Trypticase	2,0 %
NaCl	0,5 %
Tioglicolato de sódio	0,2 %
Formaldeído sulfoxilato de sódio	0,1 %
Ágar-ágar	1,5 %
pH (ajustado com NaOH 10N)	7,2

Tabela 8.13: Meio nutriente

Peptona de carne	0,5 %
Extrato de carne	0,3 %
pH (ajustado com NaOH 10N)	6,8

Tabela 8.14: Meio para teste de lecitinase

Triptona	1,0 %
Tris-(hidroximetil) aminometano	0,121 %
NaCl	0,5 %
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02 %
Resazurina	0,001 %
Gema de ovo	5,0 %
Ágar-ágar	1,5 %
pH (ajustado com NaOH 10N)	8,2

8.4. Perfil de secreção de proteínas

Tabela 8.15: Tampão de lise bacteriana

Tris-HCl pH 7,5	20 mM
KCl	100 mM
EDTA	5 mM

Tabela 8.16: Tampão de amostra de proteínas 1x

Tris-HCl (pH6,8)	62,5 mM
SDS	2 %
β-mercaptoetanol	5% (v/v)
Azul de bromofenol	0,002 %
Glicerol	10 % (v/v)

Tabela 8.17: Géis 12% SDS-PAGE – 7cm

Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	1,5 mL
Acrilamida 30%/ Bis Acrilamida 0,8%	2,4 mL
SDS 10%	60µl
APS 10%	60µl
TEMED	6µl
H ₂ O Milli-Q	q.s.p. 6 mL

Tabela 8.18: Tampão de corrida Laemmli 1x (Laemmli, 1970)

Tris-base	24,6 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,5 %

Tabela 8.19: Solução de coomassie blue R-250 (CBB-R250)

Coomassie brilliant blue R-250	5,0 g
Etanol 95 % PA	50 mL
H ₂ O Milli-Q	50 mL

Tabela 8.20: Solução descorante

Etanol 95 % PA	300 mL
Ácido acético	70 mL
H ₂ O	q.s.p. 1000 mL

8.5. Atividade enzimática: proteases e celulases

Tabela 8.21: Tampão de amostra SB-nativo 4X

Tris-HCl 1M pH 6,8	2,5 mL
Glicerol	4,0 mL
H ₂ O Milli-Q	3,5 mL

8.6. Western blots

Tabela 8.22: Tampão TBS 10x

1M Tris-HCl, pH7,5	100 mL
NaCl	87g
H ₂ O Milli-Q	q.s.p. 1000 mL

8.7. Identidade genética

Tabela 8.23: Oligonucleotídeos usados nas reações de PCR

Nome	Sequência (5'-3')
pA – For	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
pH – Rev	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA
Tb11 – For	ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT
Tb12 – Rev	CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT

Tabela 8.24: Ciclagens para as reações de PCR

Gene	Temperatura	Tempo	Nº Ciclos
<i>rrs</i>	95°C	5min	1 ciclo
	94°C	30s	34 ciclos
	55°C	30s	
	72°C	1min 30s	
	72°C	10min	1 ciclo
4°C	∞	1 ciclo	
<i>hsp65</i>	95°C	2min	1 ciclo
	94°C	30s	34 ciclos
	55°C	30s	
	72°C	2min	
	72°C	5min	1 ciclo
4°C	∞	1 ciclo	

Tabela 8.25: Tampão TBE 10X

Tris-base	108 g/L
Ácido bórico	55 g/L
EDTA	9,3 g/L

Anexo II – Resultados

8.8. Curvas de crescimento

Tabela 8.26: Curva de crescimento CBMA 226 em meio LB/Tw

Tempo (h)	0,0	4,0	19,0	28,0	43,0	52,0	67,0	78,0	91,0	100,0
#1	0,127	0,142	0,148	0,108	0,111	0,114	0,087	0,092	0,099	0,089
#2	0,120	0,141	0,127	0,114	0,103	0,102	0,084	0,078	0,087	0,100
#3	0,111	0,120	0,110	0,099	0,079	0,084	0,091	0,083	0,072	0,119
media	0,119	0,134	0,128	0,107	0,098	0,100	0,087	0,084	0,086	0,103
desvpad	0,008	0,012	0,019	0,008	0,017	0,015	0,004	0,007	0,014	0,015

Tempo (h)	163,0	172,0	186,0	197,5	210,0	222,0	234,0	241,5	257,5	268,0
#1	4,620	4,100	3,600	3,330	2,460	2,310	1,350	1,515	1,545	1,795
#2	3,400	4,430	3,670	3,230	2,475	2,190	1,250	1,165	1,235	1,475
#3	3,130	4,190	3,840	3,660	2,960	2,625	1,495	1,670	1,310	1,485
media	3,717	4,240	3,703	3,407	2,632	2,375	1,365	1,450	1,363	1,585
desvpad	0,794	0,171	0,123	0,225	0,284	0,225	0,123	0,259	0,162	0,182

Tabela 8.27: Curva de crescimento CBMA 234 em meio LB/Tw

Tempo (h)	0,0	4,0	19,0	28,0	43,0	52,0	67,0	78,0	91,0	100,0
#1	0,120	0,236	0,948	1,790	4,970	5,280	4,930	4,510	3,980	3,980
#2	0,136	0,254	0,970	1,750	4,260	4,950	4,580	3,920	2,340	2,620
#3	0,135	0,256	0,994	1,790	4,970	5,190	5,120	4,660	4,330	4,700
media	0,130	0,249	0,971	1,777	4,733	5,140	4,877	4,363	3,550	3,767
desvpad	0,009	0,011	0,023	0,023	0,410	0,171	0,274	0,391	1,062	1,056

Tabela 8.28: Curva de crescimento CBMA 247 em meio LB/Tw

Tempo (h)	0,0	24,0	48,0	72,0	96,0
#1	0,153	1,280	1,855	2,740	3,210
#2	0,159	1,782	2,675	2,630	3,000
#3	0,172	1,720	2,710	2,570	3,120
media	0,161	1,594	2,413	2,647	3,110
desvpad	0,010	0,274	0,484	0,086	0,105

Tabela 8.29: Curva de crescimento CBMA 271 em meio LB/Tw

Tempo (h)	0,0	4,0	18,0	29,5	42,0	53,5	66,0	73,5	89,5	100,0
#1	0,105	0,178	0,338	0,618	0,820	1,145	1,240	1,340	2,000	1,980
#2	0,102	0,189	0,339	0,624	0,845	1,190	1,245	1,660	1,985	2,175
#3	0,106	0,194	0,349	0,596	0,815	1,155	1,365	1,335	1,600	1,770
media	0,104	0,187	0,342	0,613	0,827	1,163	1,283	1,445	1,862	1,975
desvpad	0,002	0,008	0,006	0,015	0,016	0,024	0,071	0,186	0,227	0,203

Tabela 8.30: Curva de crescimento CBMA 271 em meio St/Tw

Tempo (h)	0,0	18,0	42,0	73,5	100,0
#1	0,159	0,338	0,524	0,696	0,864
#2	0,103	0,284	0,416	0,620	0,808
#3	0,102	0,296	0,384	0,636	0,720
media	0,121	0,306	0,441	0,651	0,797
desvpad	0,033	0,028	0,073	0,040	0,073

Tabela 8.31: Curva de crescimento CBMA 293 em meio LB/Tw

Tempo (h)	0,0	4,0	19,0	28,0	43,0	52,0	67,0	78,0	91,0	100,0
#1	0,135	0,171	0,436	0,624	2,300	3,840	4,220	3,570	2,960	2,580
#2	0,138	0,174	0,472	0,610	2,330	4,030	4,320	3,580	2,890	2,790
#3	0,140	0,165	0,386	0,542	1,850	3,340	2,810	2,410	1,900	2,330
media	0,138	0,170	0,431	0,592	2,160	3,737	3,783	3,187	2,583	2,567
desvpad	0,003	0,005	0,043	0,044	0,269	0,356	0,844	0,673	0,593	0,230

Tabela 8.32: Curva de crescimento CBMA 294 em meio LB/Tw

Tempo (h)	0,0	24,0	48,0	72,0	96,0
#1	0,153	1,280	1,855	2,740	3,210
#2	0,159	1,782	2,675	2,630	3,000
#3	0,172	1,720	2,710	2,570	3,120
media	0,161	1,594	2,413	2,647	3,110
desvpad	0,010	0,274	0,484	0,086	0,105

Tabela 8.33: Curva de crescimento CBMA 295 em meio LB/Tw

Tempo (h)	0,0	24,0	48,0	72,0	96,0
#1	0,153	1,280	1,855	2,740	3,210
#2	0,159	1,782	2,675	2,630	3,000
#3	0,172	1,720	2,710	2,570	3,120
media	0,161	1,594	2,413	2,647	3,110
desvpad	0,010	0,274	0,484	0,086	0,105

Tabela 8.34: Curva de crescimento CBMA 326 em meio LB/Tw

Tempo (h)	0,0	17,0	24,0	41,5	48,5	66,0	72,5	88,5	96,0
#1	0,068	0,162	0,229	0,336	0,448	1,128	1,292	1,615	1,655
#2	0,071	0,154	0,238	0,418	0,494	1,176	1,332	1,720	1,640
#3	0,072	0,160	0,241	0,390	0,430	1,076	1,220	1,595	1,715
media	0,070	0,159	0,236	0,381	0,457	1,127	1,281	1,643	1,670
desvpad	0,002	0,004	0,006	0,042	0,033	0,050	0,057	0,067	0,040

Tabela 8.35: Curva de crescimento CBMA 326 em meio St/Tw

Tempo (h)	0,0	17,0	24,0	41,5	48,5	66,0	72,5	88,5	96,0
#1	0,114	0,192	0,237	0,302	0,294	0,350	0,372	0,522	0,544
#2	0,096	0,174	0,222	0,262	0,270	0,344	0,340	0,490	0,544
#3	0,096	0,175	0,227	0,276	0,256	0,304	0,314	0,472	0,518
media	0,102	0,180	0,229	0,280	0,273	0,333	0,342	0,495	0,535
desvpad	0,010	0,010	0,008	0,020	0,019	0,025	0,029	0,025	0,015

Tabela 8.36: Curva de crescimento CBMA 329 em meio LB/Tw

Tempo (h)	0,0	4,0	22,0	28,0	46,0	51,5	70,0	76,0	93,0	100,0
#1	0,105	0,191	1,548	1,812	2,600	2,630	2,410	2,480	2,330	2,420
#2	0,111	0,206	1,568	1,808	2,480	2,710	2,500	2,390	2,340	2,450
#3	0,112	0,203	1,568	1,948	2,590	2,630	2,540	2,540	2,460	2,670
media	0,109	0,200	1,561	1,856	2,557	2,657	2,483	2,470	2,377	2,513
desvpad	0,004	0,008	0,012	0,080	0,067	0,046	0,067	0,075	0,072	0,137

Tabela 8.37: Curva de crescimento CBMA 329 em meio St/Tw

Tempo (h)	0,0	17,0	24,0	41,5	48,5	66,0	72,5	88,5	96,0	163,0
#1	0,114	0,205	0,329	0,372	0,590	0,608	0,772	0,840	1,044	1,184
#2	0,110	0,186	0,324	0,372	0,578	0,640	0,754	0,848	1,068	1,160
#3	0,111	0,186	0,305	0,341	0,474	0,536	0,690	0,726	0,952	1,000
media	0,112	0,192	0,319	0,362	0,547	0,595	0,739	0,805	1,021	1,115
desvpad	0,002	0,011	0,013	0,018	0,064	0,053	0,043	0,068	0,061	0,100

8.9. Ensaio Enzimático

Tabela 8.38: Atividade enzimática para celulase com amostras do lisado total

Isolado		0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
CBMA 226	1	0,9638	0,3367	0,4533	0,3396	0,3899
	2	0,7253	0,3585	0,4486	0,3802	0,4328
	3	0,7843	0,3462	0,4718	0,3738	0,3945
CBMA 234	1	0,7194	0,4150	0,4541	0,3370	0,3267
	2	0,8883	0,4070	0,5557	0,4081	0,4637
	3	0,6285	0,3749	0,5546	0,4018	0,4145
CBMA 247	1	0,6610	0,4985	0,6579	0,4723	0,4757
	2	0,5748	0,5395	0,7105	0,6233	0,5770
	3	0,6609	0,5343	0,7169	0,5931	0,5870
CBMA 271	1	0,5825	0,4506	0,6188	0,4176	0,4216
	2	0,5339	0,4911	0,6369	0,5056	0,4701
	3	0,5515	0,4995	0,6688	0,5675	0,5013
CBMA 293	1	0,5016	0,4413	0,4094	0,3561	0,4075
	2	0,4568	0,3664	0,5957	0,3996	0,4202
	3	0,4586	0,3607	0,4618	0,4246	0,4463
CBMA 294	1	0,4834	0,3993	0,4775	0,4110	0,4147
	2	0,5026	0,4118	0,5292	0,4510	0,4812
	3	0,4609	0,4211	0,5416	0,4789	0,4556
CBMA 295	1	0,5996	0,4145	0,5341	0,4281	0,4422
	2	0,5545	0,4481	0,6121	0,4992	0,5489
	3	0,5676	0,4638	0,6033	0,5172	0,4802
CBMA 326	1	0,5450	0,4171	0,5734	0,4188	0,4713
	2	0,4781	0,5024	0,6471	0,4840	0,5579
	3	0,5293	0,5171	0,6640	0,5510	0,5103
CBMA 329	1	0,4790	0,4179	0,5065	0,4100	0,4089
	2	0,5300	0,4243	0,5017	0,4407	0,4306
	3	0,4715	0,4261	0,5219	0,4439	0,4185

Tabela 8.39: Atividade enzimática para celulase com amostras do filtrado de cultura

Tempo	CBMA 226	CBMA 234	CBMA 247	CBMA 271	CBMA 293	CBMA 294	CBMA 295	CBMA 326	CBMA 329
0 h	0,2639	0,2502	0,2352	0,2432	0,2504	0,2486	0,2108	0,2235	0,2056
22 h	0,2089	0,2194	0,1923	0,2136	0,2031	0,1542	0,1894	0,1599	0,1811

8.10. Alinhamento *rrs*

```

CBMA271 TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCGATCTGCCCGCACTTTGGGATAAGCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATAGGACCACGTGCTT-CATG-GCGCGTGGTGGAAAGC--TTTT
CBMA326 TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCGATCTGCCCGCACTTTGGGATAAGCCCGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATAGGACCACGTGCTT-CATG-GCGCGTGGTGGAAAGC--TTTT
CBMA294 TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATATGACCACGCACTT-CCTG-GTGTGTGGTGGAAAGC--TTTT
CBMA329 TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATATGACCACGCACTT-CCTG-GTGTGTGGTGGAAAGC--TTTT
CBMA295 TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATATGACCACGCACTT-CCTG-GTGTGTGGTGGAAAGC--TTTT
CBMA247 TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATATGAGGGTCTGACCTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATATGACCACGCACTT-CCTG-GTGTGTGGTGGAAAGC--TTTT
CBMA234 TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATATGACCACGCTCTT-CATG-GGGTGTGGTGGAAAGC--TTTT
CBMA293 TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATATGACCACGCTCTT-CATG-GGGTGTGGTGGAAAGC--TTTT
CBMA226 TGCTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATAGGACCACGCGCTT-CATG-GTGTGTGGTGGAAAGC--TTTT
septi TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATATGACCACGCACTT-CCTG-GTGTGTGGTGGAAAGC--TTTT
mucog TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATAGGACCACGCGCTT-CATG-GTGTGTGGTGGAAAGC--TTTT
salmon TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACACACTT-CATG-GTGTGTGGTGGAAAGC--TTTT
mc2155 TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGAATACACCTGCTGGTTCGCATGGCTGGTAGGGGAAAGC--TTTT
BCG TACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACGGGATG-CATG-TCTTGTGGTGGAAAGCCTTTA

CBMA271 GCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATAGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
CBMA326 GCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATAGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
CBMA294 GCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
CBMA329 GCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
CBMA295 GCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
CBMA247 GCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
CBMA234 GCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
CBMA293 GCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
CBMA226 GCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
septi GCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
mucog GCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
salmon GCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATAGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
mc2155 GCGGTGTGGGATGGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG
BCG GCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATAGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGG

CBMA271 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAG---CG-----AAAGTGACGG
CBMA326 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAG---CG-----AAAGTGACGG
CBMA294 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCATAGGGACGAAG---CG-----CAAGTGACGG
CBMA329 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCATAGGGACGAAG---CG-----CAAGTGACGG
CBMA295 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCATAGGGACGAAG---CG-----CAAGTGACGG
CBMA247 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCATAGGGACGAAG---CG-----CAAGTGACGG
CBMA234 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCATAGGGACGAAG---CG-----CGAGTGACGG
CBMA293 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCATAGGGACGAAG---CG-----CAAGTGACGG
CBMA226 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCATAGGGACGAAG---CG-----TGAGTGACGG
septi GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCATAGGGACGAAG---CG-----CAAGTGACGG
mucog GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCATAGGGACGAAG---CG-----CAAGTGACGG
salmon GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAG---CG-----AAAGTGACGG
mc2155 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCACAGACGAAG---CG-----CAAGTGACGG
BCG GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCACCATCGACGAAGTCCGGTTCTCTCGGATTGACGG

```

CBMA271 AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAGAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
CBMA326 AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAGAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
CBMA294 AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
CBMA329 AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
CBMA295 AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
CBMA247 AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
CBMA234 AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
CBMA293 AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
CBMA226 AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
septi AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
mucog AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
salmon AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
mc2155 AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC
BCG AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGC

8.11. Alinhamento *hsp65*

CBMA293 GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTTGCCAAGAAGACGGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 CBMA326 GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTTGCCAAGAAGACGGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 CBMA271 GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTTGCCAAGAAGACGGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 CBMA234 GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTTGCCAAGAAGACGGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 CBMA226 GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTTGCCAAGAAGACGGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 CBMA295 GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCAGAGCTGGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCGAGGCGACGGCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 CBMA329 GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCAGAGCTGGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCGAGGCGACGGCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 CBMA294 GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTGGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCGAGGCGACGGCACCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 CBMA247 GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCAGAGCTGGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCGAGGCGACGGCACCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 septi GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCCGAGCTGGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCGGGCGACGGCACCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 phoca GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTGGTCAAAGGAAGTTGCCAAGAAGACGGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 mucog GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTGGTCAAAGGAAGTTGCCAAGAAGACGGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 salmo GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTGGTCAAAGGAAGTTGCCAAGAAGACCGATGACGTCGCGGGTGACGGCACTACTACCGCCACCGTGTCTGGC
 mc2155 GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTCGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACCGACGACGTCGCGGGCGACGGCACCACCACCACCCGCCACCGTGTCTGGC
 BCG GTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGATCCGTACGAGAAGATCGGCGCCGAGCTGGTCAAAGAGGTAGCCAAGAAGACCGATGACGTCGCGGGTGACGGCACCACGACGGCCACCGTGTCTGGC

CBMA293 ACAGGCTCTGGTTTCGCGAAGGTTCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGGCCATCACCAAGAGCCTGCTGGCTTCCGCCAAGGAGGTCGAG
 CBMA326 ACAGGCCCTGGTTTCGCGAAGGTTCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGGCCATCACCAAGAGCCTGCTGGCTTCCGCCAAGGAGGTCGAG
 CBMA271 CCAGGCCCTGGTTTCGCGAAGGCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGGCCGTCACCAAGAGCCTGCTGGCTTCCGCCAAGGAGGTCGAG
 CBMA234 CCAGGCTCTGGTTTCGCGAAGGTTCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGGCTGTGACCGCTGGCTGCTCGCTTCCGCCAAGGAGGTCGAG
 CBMA226 CCAGGCCCTGGTTTCGCGAAGGCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGGCCGTCACCGCCGGCTGCTCAAGTCCGCCAAGGAGGTCGAG
 CBMA295 CCAGGCCCTGGTTTCGCGAAGGTTCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTTGGTCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGAAGGTCACCGAGACGCTGCTGAAGTCCGCCAAGGAGGTCGAG
 CBMA329 CCAGGCCCTGGTTTCGCGAAGGTTCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTTGGTCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGAAGGTCACCGAGACGCTGCTGAAGTCCGCCAAGGAGGTCGAG
 CBMA294 CCAGGCCCTGGTTTCGCGAAGGTTCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTTGGTCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGAAGGTCACCGAGACGCTGCTGAAGTCCGCCAAGGAGGTCGAG
 CBMA247 CCAGGCCCTGGTTTCGCGAAGGTTCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTTGGTCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGAAGGTCACCGAGACGCTGCTGAAGTCCGCCAAGGAGGTCGAG
 septi CCAGGCCCTGGTTTCGCGAAGGTTCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGAAGGTCACCGAGACCTCCTGAAGTCCGCCAAGGAGGTCGAG
 phoca TCAGGCCCTGGTTTCGCGAAGGCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGGCTGTACCAAGGCCCTGCTGGCTTCCGCCAAGGAGGTCGAG
 mucog CCAGGCCCTGGTTTCGCGAAGGCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGGCTGTACCAAGGCCCTGCTGGCTTCCGCCAAGGAGGTCGAG
 salmo TCAGGCTCTGGTCAAAGAAGGTTCTGCGTAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGGCTGTACCAAGGCCCTGCTGGCTTCCGCCAAGGAGATCGAC
 mc2155 ACAGGCCCTGGTTTCGTAAGGTTCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGAAGGTCACCGAGACGCTGCTGAAGAGGCCAAGGAGGTCGAG
 BCG CCAGGCCCTGGTTTCGCGAGGGCTGCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCTCAAACGCGGCATCGAAAAGGCCGTCGAGAAGGTCACCGAGACCTGCTCAAGGGCGCCAAGGAGGTCGAG

CBMA293 ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGCATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 CBMA326 ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGCATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 CBMA271 ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGCATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 CBMA234 ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGTATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 CBMA226 ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGTATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 CBMA295 ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGTATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGCGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 CBMA329 ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGTATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGCGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 CBMA294 ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGTATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGCGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 CBMA247 ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGTATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGCGACCTAGTTCGCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 septi ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGTATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 phoca ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGTATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 mucog ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGTATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 salmo ACCAAGGAGCAGATCGCGGCCACCGCGGGAATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGGTGATCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTTGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGTCCAACAC
 mc2155 ACCAAGGAGCAGATCGTGCACCCGCGGTATCTCCGCGGTGACCAGTCCATCGGTGACCTACTCGCAAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGAGCAACAC
 BCG ACCAAGGAGCAGATTTCGCGCCACCGCAGCGATTTCCGCGGGTACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTATCACCGTCGAGGAGTCCAACAC