

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

### ***MELISSA PONTES PEREIRA***

Perfil imunoproteômico da resposta humoral na revacinação com *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, a cepa vacinal brasileira contra a tuberculose

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

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

**RIO DE JANEIRO**

2009

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

P436

Pereira, Melissa Pontes.

Perfil imunoproteômico da resposta humoral na revacinação com *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, a cepa vacinal brasileira contra a tuberculose / Melissa Pontes Pereira. – Rio de Janeiro, 2009.

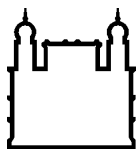
xix, 128 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2009.

Bibliografia: f. 96-122

1. BCG Moreau. 2. Tuberculose. 3. Proteínas Extracelulares. 4. Revacinação. I. Título.

CDD 616 995



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***MELISSA PONTES PEREIRA***

**Perfil imunoproteômico da resposta humoral na revacinação com *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, a cepa vacinal brasileira contra a tuberculose**

**ORIENTADOR(A): Dra. Leila de Mendonça Lima**

**Aprovada em: 06/11/2009**

### **EXAMINADORES:**

**Dr<sup>a</sup>.** Maria Cristina Vidal Pessolani (IOC/FIOCRUZ) – **Presidente e Revisora**

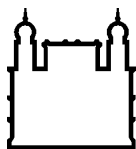
**Dr<sup>a</sup>.** Cynthia Silveira Horn (IPEC/FIOCRUZ)

**Dr.** Afrânio Lineu Kritski (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

**Dr.** Dário Eluan Kalume (IOC/FIOCRUZ) - Suplente

**Dr.** Milton Moraes (IOC/FIOCRUZ) - Suplente

Rio de Janeiro, 06 de Novembro de 2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Perfil imunoproteômico da resposta humoral na revacinação com *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, a cepa vacinal brasileira contra a tuberculose**

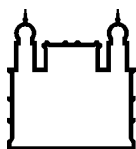
#### **RESUMO**

#### **TESE DE DOUTORADO**

**Melissa Pontes Pereira**

A tuberculose (TB) ocupa o segundo lugar em causa morte por doença infecciosa de notificação compulsória. Uma das estratégias para seu controle é a vacinação, e a única vacina disponível é o BCG (Bacilo de Calmette-Guèrin). Embora utilizada mundialmente, a vacina BCG apresenta diversas limitações. O Brasil utiliza a cepa Moreau para produção da vacina, sendo o único país do mundo a utilizar, desde os anos 1930, esta cepa para vacinação. Como observado para outros patógenos intracelulares, a imunidade celular desempenha papel importante na proteção do hospedeiro contra a TB. O IFN $\gamma$ , secretado por células T, é descrito como uma citocina particularmente importante participando na resposta imune protetora, e é empregado como correlato de proteção, embora sua utilidade seja ainda questionável, sobretudo em populações adultas. Isto evidencia a necessidade de buscar biomarcadores adicionais que permitam uma correlação de proteção mais confiável. As proteínas extracelulares micobacterianas estão entre as primeiras moléculas a interagirem com o sistema imune do hospedeiro, e uma melhor compreensão de seu papel imunomodulatório poderá contribuir para o desenvolvimento de novos alvos para o controle e erradicação da TB. Uma estratégia para a identificação de proteínas imunologicamente relevantes é a análise do imunoproteoma, que combina a abordagem proteômica com uma apresentação imunológica dos dados. A caracterização de soros, provenientes de indivíduos vacinados, muitas vezes revela diferentes padrões de reconhecimento que podem ser indicativos dos diferentes graus de proteção conferidos pela vacina em uma população heterogênea. Empregamos assim esta tecnologia, combinando a separação por eletroforese bi-dimensional (2DE) de antígenos protéicos extracelulares da cepa vacinal brasileira seguida de *western-blot*, para avaliar o perfil imunoproteômico da resposta humoral de indivíduos saudáveis, PPD negativos, revacinados com BCG Moreau e classificados como alto e baixo produtores de IFN $\gamma$ . Nossos resultados revelam um padrão de reconhecimento claramente distinto entre os grupos avaliados, correlacionado com o perfil de produção de IFN $\gamma$ . Dentre as proteínas imunoreativas identificadas, um grupo

(antígenos do complexo 85) foi reconhecido por todos os soros incluídos no estudo, inclusive controles. Alguns antígenos foram reconhecidos exclusivamente pelos indivíduos classificados como alto produtores de IFN $\gamma$  e outros somente pelos indivíduos enquadrados no grupo de baixo produtores. Algumas proteínas foram selecionadas e produzidas sob forma recombinante em *Escherichia coli* possibilitando sua avaliação mais detalhada frente aos soros individualizados. Entre os antígenos diferencialmente reconhecidos, as proteínas Mpb70 e Mpb83 se destacaram como potenciais correlatos da proteção oferecida pela vacinação com BCG Moreau, tendo sido reconhecidos somente pelos indivíduos produtores de elevados níveis de IFN $\gamma$ . Estudos adicionais são necessários para determinar a aplicabilidade efetiva de tais antígenos como potenciais correlatos da proteção conferida pela vacinação com BCG Moreau. Este é o primeiro relato que detalha o perfil de reconhecimento sorológico por indivíduos revacinados com BCG Moreau frente a antígenos extracelulares da cepa homóloga, e contribui para uma melhor compreensão da cepa vacinal brasileira contra a TB.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ABSTRACT

#### TESE DE DOUTORADO

**Melissa Pontes Pereira**

Tuberculosis (TB) holds the second place as cause of death by an infectious disease of obligatory notification. One of the strategies for its control is vaccination, and the only vaccine available is BCG (Bacillus Calmette-Guerin). Although used worldwide, BCG shows various limitations. Brazil uses the Moreau strain for vaccine production, being the only country in the world to use, since the 1930s, this strain for vaccination. As observed for other intracellular pathogens, cellular immunity plays an important role in host protection against TB. IFN $\gamma$  secreted by T cells is described as a particularly important cytokine participating in protective immune responses, being used as a correlate of protection, although its utility remains questionable, especially in adult populations. This highlights the need to seek additional biomarkers yielding better surrogates of protection. Mycobacterial extracellular proteins are among the first molecules to interact with the host immune system and a better understanding of their immunomodulatory role may contribute to the development of new targets for the control and eradication of TB. A strategy for the identification of immunologically relevant proteins is the analysis of the immunoproteome, combining a proteomic approach with an immunological presentation of the data. The characterization of sera from vaccinated individuals often reveals different patterns of recognition that may be indicative of the different degrees of protection conferred by the vaccine in a heterogeneous population. We have thus employed this technology, combining the separation by two-dimensional electrophoresis (2DE) of extracellular proteins from the Brazilian vaccine strain, followed by Western blot to assess the immunoproteomic profile of the humoral response in healthy, PPD negative subjects, re-vaccinated with BCG Moreau and classified as high or low producers of IFN $\gamma$ . Our results reveal a clearly distinct recognition pattern between the evaluated groups, correlating with the profile of IFN $\gamma$  production. Among the immunoreactive proteins identified, one group (85 complex antigens) was recognized by all sera included in the study, including controls. Some antigens were recognized only by individuals classified as high producers of IFN $\gamma$  and others only by the individuals included in the group of low producers. Some proteins were selected and produced in recombinant form in *Escherichia coli* allowing for their further evaluation against the individual sera. Among the antigens differentially recognized, Mpb70 and Mpb83 proteins stood out as potential correlates of protection offered by vaccination with BCG Moreau, and

were only recognized by individuals producing high levels of IFN $\gamma$ . Additional studies are needed to determine the effective applicability of these antigens as potential correlates of protection provided by vaccination with BCG Moreau. This is the first report detailing the serologic recognition profile of individuals re-vaccinated with BCG Moreau against extracellular antigens of the homologous strain, and contributes to a better understanding of the Brazilian vaccine strain against TB.

**Dedico este trabalho aos pais e minhas  
irmãs pelo amor incondicional,  
admiração e incentivo aos meus ideais.**



*“On ne voit bien qu’avec le coeur.  
L’essentiel est invisible pour les  
yeux.”*

“Só se vê bem com o coração. O essencial é  
invisível para os olhos.”

Antoine de Saint-Exupéry

À Deus por me dar força a cada dia e perseverança para continuar;

Aos meus pais, Maria Celia e Paulo Cesar, pelo exemplo de caráter, amor incondicional, apoio e incentivo a todos os meus ideais e decisões, e pelo suporte emocional tolerando meus stress!

As minhas irmãs, Inessa e Milena, por existirem em minha vida, e pela compreensão e admiração;

Ao Leonardo, “o noivo”, pelo amor, carinho, dedicação e admiração a mim dispensados. Por sempre incentivar meu crescimento profissional, em especial o estímulo para aprender a língua francesa o que me possibilitou fazer o curso de bioquímica de proteínas no Instituto Pasteur – Paris. Sem dúvida, ele é o melhor e mais conclusivo “resultado” desta tese;

A Dra Leila de Mendonça Lima pela confiança, oportunidades e orientação ao longo destes quatro anos;

Ao Dr Wim Degrave por ter me cedido um dia de sua atribulada agenda para cordialmente “blotar” minhas proteínas recombinantes;

A Dra Joseli Lannes pela gentileza ao me dar uma aula de imunologia fundamental para compreensão de meus dados;

A Dra Maria Cristina Vidal Pessolani pela atenciosa revisão da minha tese;

A Dra Theolis Barbosa e Evelin Oliveira, do CPqGM/Fiocruz BA pela colaboração;

A todos os colegas do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática (salas 101, 105, 104, 106, 110 e 201) pela agradável convivência diária, pelo companheirismo e pelos inúmeros momentos de descontração e festinhas;

Em especial às meninas da sala 101: Cristiane (Cris), Fabiane (Fabi), Luciana (Luca), Márcia, Mariana W.(Mari), Palominha, Patricinha e Talita, pelas inúmeras mãozinhas essenciais para a conclusão deste trabalho, pela alegre e agradável companhia diária, pelos debates e enquetes calorosos! E principalmente pelo apoio emocional, cada uma a sua maneira, nos dias chorosos (e foram muitos). Esta tese também é de vocês!!! Ops! Não esquecendo o Gus, que embora tenha saído antes da conclusão deste trabalho também foi muito companheiro.

A Mariana Waghabi, ou simplesmente Mari, por toda ajuda na padronização dos *Western blot*, pelas inúmeras divertidas e providências caronas para Nikit, pelos primordiais incentivos em acreditar que é possível!!!! Que ao final tudo dará certo! E principalmente por ser uma cientista admirável;

A Márcia Bêrredo por ser a corda da minha caçamba, ou a caçamba da minha corda! Talvez Leila responda melhor a final ela nos definiu assim! Por todos os ensinamentos proteômicos, pelas inúmeras ajudas e companheirismo, sobretudo na reta final. Por ter si tornado muito mais que uma colega de trabalho transformando-se indispensável na minha vida. Que Deus te conserve assim tão generosa. Estendo meus agradecimentos a sua família, Marcelo, Luíza e Dudu por terem sido minha segunda família ao longo da redação desta tese, me dando literalmente casa comida e roupa lavada, e mais que isso, alegria e compreensão ao me cederem esposa e mãe por inúmeras noites!

A Ana Carolina Guimarães (Carol) por estar presente na minha vida há 27 anos e por ter me apresentado o laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática;

A dona Neiva pelo amor com que cuida de todos do Lab, fundamental para o bom andamento de qualquer projeto;

Aos que já passaram pelo laboratório de genômica funcional e bioinformática, Renatita, Mariana Reis, Renata Ferreira, muito obrigado pelo apoio e ajuda. Não esquecendo o Rogério, que não está mais entre nós, mas enquanto esteve solucionava todos os nossos problemas administrativos com competência.

As minhas amigas Biola e Apô por serem AMIGAS para o que der e vier;

A Carolina Teixeira, Flavia Nirello, Michelle Araújo e Renata Cunha, parceiras de todas as horas, que nem a distância geográfica prejudica. Muito obrigada pela admiração e compreensão por minhas ausências!!

Aos voluntários que concordaram em participar deste projeto.

As instituições de fomento: PDTIS, Millenium, Pronex, FAPERJ e IOC (pela minha bolsa)

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – grau Celsius

cm - centímetro

mA – miliamper

min. - minuto

mL – mililitro

mM – milimolar

mm - milímetro

M – molar

µg – micrograma

µL – microlitro

µm - micrômetro

1-D – uni-dimensional

2DE PAGE - eletroforese bidimensional

ACN – acetoneitrila

AG - arabinogalactanas

Ag85 – Antígeno 85

APCs - células apresentadoras de antígeno (*Antigen Presentation Cells*)

A=T – Adenina e timina

BAAR - Bacilo Álcool-Ácido resistente

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

BSA – Albumina de soro bovino

CBB – coomassie brilliant blue

CFP10 - *culture filtrate protein-10*

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato

Da - Dalton

DMA - N,N-dimetilacrilamida

DNPS - Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária

DNA – ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade Ótica

DOTS - tratamento diretamente observado (*Directly Observed Treatment Short Course*)

DTH – Hipersensibilidade Tardia (*Delayed-type hypersensitivity*)

DTT – Ditiotreitól

ELISA – Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

ESAT-6 - *early secreted antigenic target 6 kD*  
FAP - Fundação Atauípho de Paiva  
FC – Filtrado de Cultura  
g – aceleração da gravidade  
h – hora  
H37Rv – “R” de *rough* - rugoso em inglês e “v” de virulento. Cepa de *Mycobacterium tuberculosis* virulenta isolada de um paciente com tuberculose crônica pulmonar em 1905.  
HIV – vírus da imunodeficiência humana (Human Immunodeficiency Virus)  
Hsp – Proteína de choque térmico (*Heat shock protein*)  
IEF – Focalização isoeétrica (*Isoelectric Focusing*)  
IFN $\gamma$  - Interferon Gama  
IgA – Imunoglobulina A  
IgG – Imunoglobulina G  
IL – Interleucina  
IPG – gradiente imobilizado de pH  
IS6110 – sequência de inserção 6110  
kb - quilobase  
kDa – quilodalton  
LAM – lipoarabinomanana  
LB - Luria Bertani  
LM - Lipomanana  
MA - Ácidos Micólicos  
MALDI – Desorção/Ionização a Laser Assistido por Matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*)  
MHC-I Complexo Principal de Histocompatibilidade I  
MHC-II Complexo Principal de Histocompatibilidade II  
MSB - Ministério da Saúde do Brasil  
MS – *Mass Spectrometry*  
MTb - *Mycobacterium tuberculosis*  
MW – Peso molecular (*molecular weight*)  
NTA - ácido Nitrilotriacético  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
p/v – peso/volume  
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis)

pb (s) – par (es) de base

PBMC - células mononucleares de sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS – Salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde

PDIM - Ftiocerol

PG - Peptideoglicanos

PGL - Glicolídeos Fenólicos

pH - potencial Hidrogeniônico

pI - ponto Isoelétrico

PMF – Impressão da massa do peptídeo (Peptide mass fingerprint)

PPD – Derivado Protéico Purificado (*Purified Protein Derivative*)

PPM – parte por milhão

PSD – *Post-source decay*

qsp – quantidade suficiente para

RD - Região de Diferença ou Região de Deleção

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNA – ácido ribonucléico

rRNA – ácido ribonucléico ribossomal

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SF – Superfície

SUS – Sistema Único de Saúde

T - Tempo

TB - Tuberculose

TBP – Tributílfosfina

TCA – Ácido Tricloro Acético

TEA - Trietanolamina

TEMED – N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina

TFA – ácido trifluoro acético

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TOF – Tempo de vôo (*Time of Flight*)

TRIS - tris-hidroxi-metil-amino-metano

TRITON X -114 - [(1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol]

UNICEF – *United Nations Children's Fund* (Fundo das Nações Unidas para as Crianças)

v – volts

v/v – volume/volume

WB – *Western blot*

WHO – *World Health Organization*



## Sumário

Conteúdo	Página
<b>RESUMO</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1 A Tuberculose	01
1.2 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e o Agente Etiológico da tuberculose	02
1.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : Agente etiológico da tuberculose	03
1.4 Envelope Celular: Estrutura e Função	03
1.5 Métodos Diagnósticos	05
1.5.1 Diagnóstico da infecção latente por <i>M. tuberculosis</i>	05
1.6 Imunologia da Tuberculose	07
1.6.1 Biomarcadores – Importância e Ferramenta para discriminação entre proteção, infecção e doença	09
1.7 <i>Mycobacterium bovis</i> BCG: a única vacina disponível contra Tuberculose	11
1.7.1 Breve histórico	11
1.7.2 Genealogia das vacinas BCG – Diferentes BCGs diferentes vacinas	12
1.7.3 O uso Mundial das diferentes BCG	15
1.7.4 Novas vacinas contra tuberculose	16
1.7.5 A cepa vacinal brasileira: <i>M. bovis</i> BCG Moreau e o esquema vacinal	16
1.7.6 Resposta imune induzida pela vacina	17
1.8 Proteínas extracelulares e seu envolvimento imunológico	18
1.9 Proteoma e Imunoproteoma como ferramentas para avaliação da resposta humoral	21

<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>25</b>
3.1	Soros	25
3.1.1	Purificação das IgGs dos “pools” de soros	27
3.2	Cepas bacterianas e plasmídeos	27
3.2.1	Cultivo de cepas bacterianas	27
3.2.2	Plasmídeo	28
3.3	Obtenção das proteínas presentes no filtrado de cultura de <i>M. bovis</i> BCG Moreau	28
3.4	Obtenção das proteínas associadas à superfície	28
3.4.1	Fracionamento com Triton X-114	28
3.5	Precipitação de proteínas	29
3.6	Determinação da concentração protéica	29
3.7	Focagem isoeétrica preparativa	29
3.8	Focalização isoeétrica (1ª dimensão)	32
3.8.1	Preparo da amostra para 1ª dimensão	32
3.9	Segunda dimensão - separação das proteínas com base no peso molecular	32
3.10	Métodos de coloração para os géis SDS-PAGE	33
3.11	“Western blot” bidimensional	33
3.12	Retirada e Processamento dos spots protéicos	34
3.13	Identificação das proteínas por espectrometria de massas em equipamento MALDI-TOF/TOF	35
3.14	Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	36
3.14.1	Amplificação das regiões codificadoras por PCR e obtenção do fragmento de DNA para clonagem no vetor de expressão pBAD-Thio TOPO	37
3.14.2	Clonagem TOPO® TA	37
3.14.3	Preparo de células competentes para eletroporação	38
3.14.4	Transformação por eletroporação	39
3.14.5	Indução rápida para identificação de recombinantes	39
3.15	Teste de expressão das proteínas recombinantes	39
3.15.1	Western Blot com anticorpo anti-6HIS	40
3.16	Teste de solubilidade das proteínas recombinantes	40
3.17	Expressão e purificação das proteínas recombinantes	41
3.18	Western Blot das proteínas purificadas frente aos soros individuais	43

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
4.1	Padronização dos ensaios de <i>imunoblot</i> bidimensionais com proteínas extracelulares de <i>M. bovis</i> BCG Moreau frente ao soro humano	44
4.1.1	<i>Western Blot</i> unidimensional	44
4.1.2	<i>Western Blot</i> bidimensional (WB-2DE)	45
4.1.3	Padronização das condições de bloqueio para os ensaios de WB bidimensionais	46
4.1.4	Avaliação da eficiência e reprodutibilidade da focalização isoeétrica preparativa (Zoom® IEF <i>Fractionator</i> )	47
4.1.5	Comparação do padrão 2DE das amostras protéicas do filtrado de cultura e de superfície de <i>M. bovis</i> BCG Moreau fracionadas ou não com Zoom® IEF <i>Fractionator</i>	48
4.1.6	Efeito da focalização isoeétrica preparativa e da purificação de IgG nos ensaios de 2DE-WB	49
4.2	Perfil Imunoproteômico das Proteínas Extracelulares de <i>M. bovis</i> BCG Moreau - Aspectos Gerais	50
4.3	O Imunoproteoma Diferencial - Filtrado de Cultura e Fração de Superfície	54
4.4	Clonagem, expressão e purificação da região codificante para as proteínas Mpt70, Mpt83, Mpt64 e GlnA1 de <i>M. bovis</i> BCG Moreau	66
4.4.1	Amplificação dos genes selecionados de <i>M. bovis</i> BCG Moreau	66
4.4.2	Subclonagem no vetor de expressão de <i>E. coli</i>	67
4.4.3	Curva de crescimento bacteriano	69
4.4.4	Avaliação das condições ótimas de expressão das proteínas recombinantes	70
4.4.5	Produção e Purificação das proteínas Mpt64, Mpt70, Mpt83 e GlnA-1	72
4.4.7	Avaliação da imunoreatividade das proteínas recombinantes	74
4.4.8	Titulação dos soros para a realização dos ensaios de WB com as proteínas recombinantes	75
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>77</b>
5.1	Padronização das condições experimentais para os ensaios de 2DE-WB	78
5.1.1	Obtenção da fração protéica de superfície	78
5.1.2	Focalização isoeétrica preparativa	79
5.2	Imunoproteoma como ferramenta para análise da resposta humoral	80
5.3	Imunoproteoma Comparativo das proteínas extracelulares de <i>M. bovis</i> BCG Moreau	82

5.4	Imunoproteoma diferencial das proteínas extracelulares de <i>M. bovis</i> BCG Moreau	83
5.4.1	Proteínas imunogênicas Mpt 70 ( <i>rv2875</i> ) e Mpt83 ( <i>rv2873</i> )	84
5.4.2	Proteína Imunogênica Mpt63 ( <i>rv1926c</i> )	86
5.4.3	Proteína Secretada Rica em Alanina e Prolina (Apa, <i>rv1860</i> )	87
5.4.4	Provável Precursor da Cutinase - Cfp21 ( <i>rv1984c</i> ) e Proteína Imunogênica Mpt64 ( <i>rv1980c</i> )	88
5.4.5	Glutamina Sintetase 1 (GlnA1, <i>rv2220</i> )	89
5.5	Clonagem e expressão das proteínas de interesse	90
5.6	Resposta Imune pela BCG Moreau em indivíduos saudáveis revacinados	91
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>94</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>96</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>123</b>
8.1	Materiais	123
8.2	Comitê de ética	128

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. A Tuberculose

A tuberculose (TB), dentre as doenças de notificação compulsória, vem ocupando o segundo lugar no *ranking* mundial em causa morte por doença infecciosa, perdendo apenas para a síndrome de imunodeficiência adquirida (WHO, 2008). O número de óbitos é em média de 2 milhões ao ano, sobretudo nos países em desenvolvimento, sendo, portanto, fortemente associada às baixas condições sócio-econômicas. Esta alta mortalidade está acompanhada por uma elevada morbidade, com cerca de 9,2 milhões de novos casos por ano (Kaufmann, 2000; Espinal, 2003; Dye, 2006; WHO, 2008) (figura 1.1).

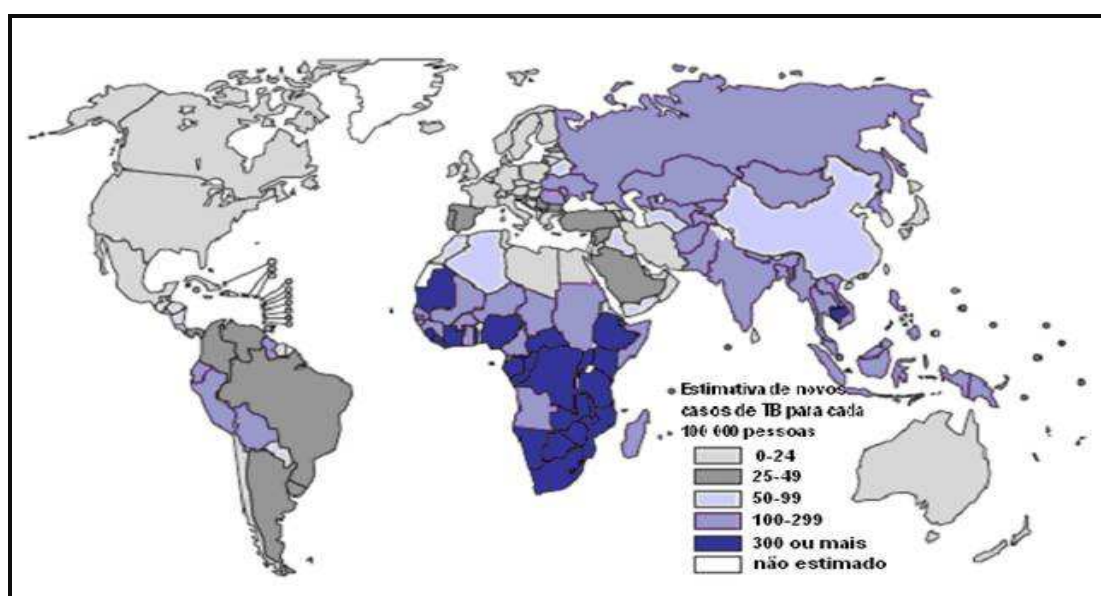


Figura 1.1: Mapa da distribuição da tuberculose ao redor do mundo, adaptado de *World Health Organization*. WHO Genebra, 2008.

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com o *Mycobacterium tuberculosis* (MTb). Todavia, cerca de 5 - 10% destes indivíduos desenvolverão a doença ativa ao longo da vida, a despeito da persistência do patógeno, uma vez que o sistema imune é altamente eficiente em contê-lo. No entanto, esta proporção pode aumentar expressivamente em indivíduos co-infectados com HIV (WHO, 2003).

A partir do início da década de 1990, fatores como o empobrecimento, urbanização, favelização, a pandemia da infecção pelo HIV e o aparecimento de

cepas de MTb resistentes a múltiplas drogas, aumentaram as ameaças à saúde pública e com isto a TB recrudescceu, mesmo nos países desenvolvidos onde parecia controlada. Diante desse quadro, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1993, declarou a TB uma emergência global, na tentativa de aumentar a conscientização pública e política para a enfermidade, e propôs a estratégia de tratamento diretamente observado (*Directly Observed Treatment Short Course – DOTS*) para ampliar as taxas de detecção e de cura (WHO, 1994).

Desta forma, a necessidade de vacinas mais eficazes contra a tuberculose, tanto para a prevenção quanto para a cura da doença ativa, e de métodos diagnósticos mais rápidos e específicos, é urgente. Atualmente, a Genômica Funcional, Proteômica e Bionfórmica são áreas que fornecem informações que permitirão o desenvolvimento de melhores ou novas intervenções para o tratamento da TB, assim como a elucidação da biologia de seu agente etiológico – *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998).

## 1.2 Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e o Agente Etiológico da Tuberculose

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* é um grupo de micobactérias patogênicas altamente relacionadas entre elas que compreende: *M. tuberculosis*, *M. africanum* (subtipos I e II), *M. bovis* (inclusive o *M. bovis* atenuado, bacilo de Calmette-Guérin, cepa vacinal), *M. bovis* subespécie *caprae*, e *M. microti* (Brosch *et al.*, 2002). Estes microorganismos possuem 99,9% de similaridade em relação à seqüência de nucleotídeos e apresentam seqüências idênticas do RNA ribossomal 16S (Boddinghaus *et al.*, 1990; Sreevatsan *et al.*, 1997). No entanto, diferem bastante entre si quanto a aspectos como: presença ou ausência de uma ampla deleção de um *locus* cromossômico, espectro de hospedeiros, fenótipos, e patogenicidade. A genômica comparativa tem identificado diversos polimorfismos entre os membros do complexo *M. tuberculosis*, o que pode ajudar a explicar a diversidade fenotípica observada entre eles. Regiões polimórficas superiores a mais ou menos 0,5 kb são denominadas regiões de diferença, ou *loci* “RD”. O valor desta informação genômica pode ser evidenciado, por exemplo, pelos estudos das diferentes cepas vacinais BCG (como revisto por Gordon *et al.* 2009).

### 1.3 *Mycobacterium tuberculosis*: Agente etiológico da tuberculose

O *M. tuberculosis* (MTb), identificado pelo médico alemão Robert Koch em 1882 como agente etiológico da tuberculose, é caracterizado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), não corado pelo método de GRAM, não esporulado, imóvel, de crescimento lento, aeróbio estrito, intracelular facultativo, capaz de ficar em um estado de dormência e que apresenta um envelope celular complexo (Wheeler e Ratledge, 1994). O tempo de geração estimado do MTb em meio sintético ou animais infectados é de 24 horas, o que contribui para a natureza crônica da doença, impõe esquemas terapêuticos longos e representa um obstáculo às pesquisas.

### 1.4 Envelope Celular: Estrutura e Função

O envelope celular micobacteriano é uma estrutura única, com uma composição química bastante complexa que diferencia o gênero *Mycobacterium* dos demais procariotos (Crick *et al.*, 2001). Esta estrutura é caracterizada por três camadas principais: a membrana plasmática, mais interna; uma porção intermediária que corresponde a um complexo covalentemente ligado, formado por peptidoglicanas, ácido micólicos e arabinogalactanas conhecido como parede celular e mais externamente por uma cápsula rica em polissacarídeos (Figura 1.2).

A membrana plasmática, primeira camada do envelope celular a partir do interior da célula, é uniforme como nas demais bactérias, não apresentando nenhuma característica peculiar às espécies micobacterianas, com exceção de alguns lipopolissacarídeos em sua composição e de substâncias, tais como carotenóides, que produzem pigmentação amarelo-laranja em algumas micobactérias não-tuberculosas (*M. goodii*, *M. kansasii*) (Beran *et al.*, 2006). No entanto, é nesta estrutura que se localiza um número expressivo de proteínas e enzimas, fundamentais para a sobrevivência celular, por estarem envolvidas em uma gama de funções como, por exemplo: transdução de sinal, processos metabólicos, geração de energia, síntese de membrana e parede celular, divisão celular e secreção de proteínas extracitoplasmáticas.

Circundando a membrana plasmática encontra-se a parede celular. Estudos visando a definição estrutural desta camada intermediária foram iniciados por volta

de 1960-1970 (Petit, *et al.* 1969; Schleifer e Klander, 1972). No entanto, foi a partir do desenvolvimento de tecnologias analíticas como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas, associadas à definição do genoma do MTb, que se obteve uma maior compreensão da composição da parede celular e de sua estrutura, assim como de suas bases genéticas e biossíntese (Brennan, 2003).

A característica bioquímica mais marcante das micobactérias é a abundância de lipídios em sua parede celular, compreendendo aproximadamente 60% do seu peso seco. Esse teor lipídico é muito mais elevado quando comparado a outras bactérias Gram-positivas (0,5%) e Gram-negativas (3%) (Brennan e Nikaido, 1995). Esta característica contribui para o caráter hidrofóbico do MTb e, provavelmente, para outras propriedades não usuais como: relativa impermeabilidade a corantes, resistência incomum a agentes ácidos e alcalinos, à ação de bactericidas e de vários antibióticos (Barry III e Mdluli, 1996; Lambert, 2002; Jarlier e Nikaido, 1994). Esta camada é constituída por um arcabouço de peptidoglicanos (PG), arabinogalactanas (AG), e ácidos micólicos (MA), ácidos graxos de cadeia longa presentes em micobactérias. Estas moléculas encontram-se covalentemente ligadas entre si formando um complexo conhecido como MA-AG-PG. Este complexo é insolúvel e referido como essencial para a estrutura da parede celular micobacteriana. Muitos medicamentos utilizados para combater infecções causadas por micobactérias possuem como alvo tal complexo. A parede micobacteriana também contém proteínas intercaladas, que podem estar em processo de exportação ou mesmo serem residentes nesta estrutura; muitas destas proteínas encontram-se associadas de forma não-covalente à superfície celular, sendo referidas muitas vezes como proteínas de superfície (SF) (Brennan, 2003).

A camada mais externa, denominada cápsula micobacteriana, é composta por lipídios livres como dimicocerosato de ftiocerol (PDIM), glicolídeos fenólicos (PGL), glicolípídeos contendo trealose, além de sulfolípidios específicos de MTb. Atravessando todo o envelope celular estão os lipídios ligados a polissacarídeos como a lipoarabinomanana (LAM), fosfatidilinositol manosídeos e lipomanana (LM). Estes estão ancorados à membrana plasmática se estendo até o exterior da parede celular e têm sido referidos, principalmente os lipoglicanos e lipoarabinomananas, como importantes moléculas imunomoduladoras da resposta imune do hospedeiro (Brennan, 2003).



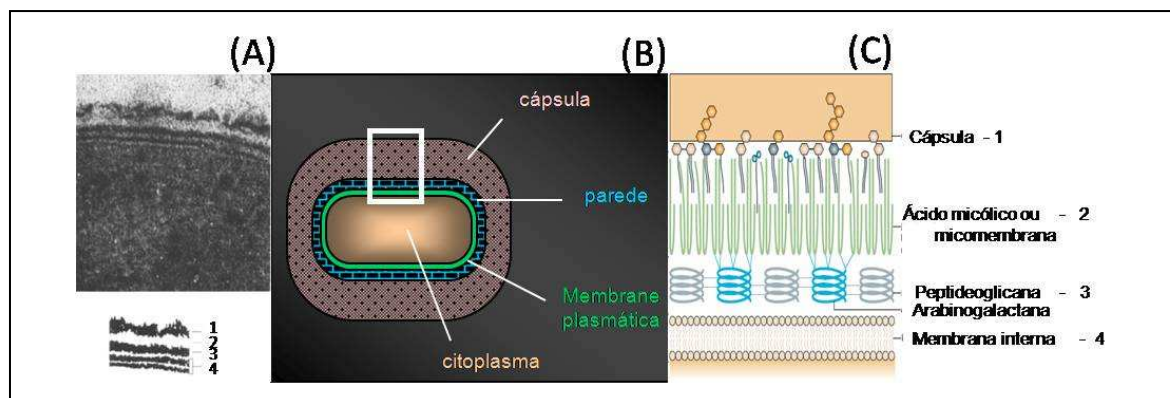


Figura 1.2. Representação esquemática do envelope micobacteriano: **A.** Microscopia eletrônica de uma célula micobacteriana. **B.** Representação esquemática da célula micobacteriana **C** - moléculas representativas da superfície micobacteriana. (www.uct.ac.za/depts/lsteyn/cellwall.html; Abdallah *et al.*, 2007).

## 1.5 Métodos Diagnósticos

O diagnóstico rápido e preciso da tuberculose constitui um elemento de extrema importância no contexto do controle global da doença. O padrão ouro permanece sendo a cultura em meio específico, associada ao exame clínico, achados radiológicos, em conjunto com a baciloscopia, através da microscopia direta pela coloração do BAAR pelo método de Ziehl-Nielsen em amostras clínicas. Estes métodos apresentam diversas limitações, além de dependerem de infraestrutura e pessoal especializado. A baciloscopia apresenta boa sensibilidade para pacientes com doença pulmonar avançada, mas baixa sensibilidade nos outros casos, incluindo co-infecção com HIV, sendo de pouca utilidade nos casos pediátricos e de TB extra-pulmonar (Perkins & Kritski, 2002). Quanto à cultura, suas principais limitações são o tempo de espera do resultado (28 a 60 dias) e a elevada taxa de falso-negativos.

O DOTS (*Directly Observed Treatment*), uma estratégia de tratamento e controle da TB implementada pela OMS, vem reduzindo a incidência da doença mundialmente. Entretanto, para ser tratado o paciente deve primeiro ser diagnosticado – a detecção de casos de TB é o “calcanhar de Aquiles” da estratégia de DOTS (Perkins e Kritski, 2002).

### 1.5.1 Diagnóstico da infecção latente por *M. tuberculosis*

A infecção por MTb, na maioria dos indivíduos, é contida pelo sistema imune do hospedeiro, persistindo assim sob forma latente, a despeito da ausência de

sintomatologia. A ativação da doença ocorre em cerca de 10% das pessoas infectadas (Stewart *et al.*, 2003; Tufariello, Chan e Flynn, 2003). Considerando que um terço da população mundial encontra-se infectada, o número de novos casos que emergem deste reservatório é extremamente elevado (Dye *et al.*, 1999). Logo um dos grandes desafios na luta contra a tuberculose é o de diagnosticar e tratar estes indivíduos antes de desenvolverem a forma ativa da doença.

O único método padronizado para a detecção de infecção latente pelo MTb é o teste cutâneo utilizando PPD (*Purified Protein Derivative*). O PPD é obtido do crescimento de *Mycobacterium bovis*, Mtb ou *Mycobacterium avium* em meio líquido. A cultura em fase estacionária é inativada pelo calor (autoclave a 121°C por 30 min) e o filtrado desta é precipitado pela adição de Ácido Tricloracético ou Sulfato de Amônia, e acrescida de Tween (Dall' Stella *et al.*, 2007).

A prova tuberculínica (reação de hipersensibilidade cutânea - reação de Mantoux) avalia a imunidade mediada por células sob a forma de hipersensibilidade tardia (*Delayed-type hypersensitivity* – DTH) em resposta à injeção intradérmica de PPD no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo. O grau da reação de DTH é determinado pelo diâmetro da induração 48h após a injeção. A interpretação da prova é feita seguindo recomendações do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2002).

Embora empregado mundialmente, sua utilização impõe uma série de limitações. Não apresenta boa acurácia, uma vez que tanto sua sensibilidade quanto especificidade são discutíveis, apresenta elevada reatividade cruzada, levando a resultados falso-positivos em indivíduos sensibilizados previamente pela vacinação com BCG e/ou exposição à micobactérias ambientais não-tuberculosas. Além disso, sua sensibilidade é reduzida em indivíduos co-infectados com HIV dada à imunossupressão, produzindo falso-negativos (Huebner *et al.*, 1994; Caiaffa *et al.*, 1995; Perkins, 2000). Há evidências que o PPD possa atuar como uma “microvacinação” agindo sobre a resposta das células T anti-tuberculose, conduzindo a positividade em testes sucessivos, devido a um efeito de *boosting* (Mawa *et al.*, 2004).

Frente à fraca especificidade do PPD em diagnosticar a infecção latente, a necessidade de novos reagentes diagnósticos torna-se evidente. A identificação de regiões do genoma de MTb ausentes no genoma de BCG e de muitas micobactérias ambientais não-tuberculosas (Andersen *et al.*, 2000; Sorensen *et al.*, 1995) forneceu

conhecimento para o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas mais específicas (Brosch *et al.*, 1998). Estas regiões são denominadas regiões de deleção (RD). Uma delas é a RD1 que codifica as proteínas secretadas: ESAT-6 (*early secreted antigenic target 6 kD*) e CFP10 (*culture filtrate protein-10*) (Andersen, 1994; Berthel *et al.*, 1998; Sorensen *et al.*, 1995).

Uma alternativa ao PPD é a análise *in vitro* dos níveis de interferon gama (IFN $\gamma$ ) secretado por células T de indivíduos previamente sensibilizados por antígenos de MTb, frente a antígenos micobacterianos (Andersen *et al.*, 2000; Barnes, 2004; Lalvani, 2003). Presume-se que um elevado nível de IFN $\gamma$ , possa ser indicativo de infecção por MTb. Embora inicialmente os ensaios de IFN $\gamma$  empregassem o PPD como antígeno estimulatório (QuantiFERON-TB -Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Austrália) (Andersen *et al.*, 2000; Barnes, 2004), os testes atuais utilizam antígenos específicos do MTb, como ESAT-6 e CFP10 (QuantiFERON-TB gold e o T SPOT-TB (Immunotec Oxford, Oxford, UK) (Lalvani, 2003).

## 1.6 Imunologia da Tuberculose

A tuberculose é tipicamente uma doença pulmonar. Os pulmões funcionam tanto como porta de entrada para o bacilo como o principal sítio de início da doença, por constituírem um ambiente favorável a replicação do patógeno (Kaufmann, 2001). Após inalação de aerossóis, o MTb é engolfado por macrófagos alveolares, sendo capaz de sobreviver dentro do fagossoma inibindo a progressão do vacúolo e a fusão final com lisossomas e conseqüente formação do fagolisossoma acidificado (revisto por Russel, 2001). Os macrófagos alveolares e as células dendríticas infectadas migram até os linfonodos adjacentes onde os antígenos micobacterianos são apresentados e a resposta tipo T<sub>H</sub>1 é iniciada (Skeiky e Sadoff, 2006).

Ambas as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> desempenham papel central no combate à infecção pelo MTb. A localização do MTb no interior do fagossoma assegura que seus antígenos sejam apresentados via MHC-II (complexo principal de histocompatibilidade) (Kaufmann, 1999). As células CD4<sup>+</sup> diferenciam-se em células T<sub>H</sub>1 secretoras de IFN $\gamma$ , que desempenha papel central na ativação da atividade microbicida dos macrófagos; desta forma, é considerado crucial para a proteção

contra a tuberculose. A diferenciação das células  $CD4^+$  em  $T_H1$  é promovida por citocinas, incluindo IL-12, secretada por células dendríticas, IL-18 e outras moléculas co-estimulatórias (Hsieh *et al.*, 1993; Trinchieri, 1995; Xu *et al.*, 1998). Indivíduos deficientes nos receptores para  $IFN\gamma$  e IL-12 são extremamente susceptíveis a infecções micobacterianas, confirmando o requerimento absoluto de células tipo  $T_H1$  para a imunidade do hospedeiro. Citocinas do tipo  $T_H2$ , como IL-4 e IL-10 são escassas, porém não totalmente ausentes (Lin *et al.*, 1996; Kaufmann, 1999; Flynn e Chan, 2001). Embora o papel do  $IFN\gamma$  no controle da tuberculose seja inquestionável, outras citocinas, em particular o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e linfotóxina (LT)- $\alpha3$ , regulam a formação e manutenção da integridade estrutural dos granulomas (Mohan *et al.*, 2001; Roach *et al.*, 2001).

A despeito de sua localização no interior do fagossoma, o MTb é capaz de estimular células  $CD8^+$  produtoras de  $IFN\gamma$  via MHC-I, todavia, a principal função destas células é eliminar a célula infectada (Flynn e Chan, 2001). A contribuição da imunidade humoral para a proteção contra a infecção pelo MTb ou desenvolvimento da doença clínica tem sido controversa. A opsonização é provavelmente um dos mecanismos efetores de anticorpos importante na infecção por MTb. Alguns grupos têm demonstrado o aumento da internalização e eliminação da micobactéria por neutrófilos e macrófagos na presença de anticorpos (Brown *et al.*, 2003; de Valliere *et al.*, 2005). Adicionalmente, micobactérias revestidas com anticorpos específicos foram mais eficientemente processadas e apresentadas por células dendríticas via estimulação das respostas  $CD4^+$  e  $CD8^+$  (Teitelbaum *et al.*, 1998; Chambers *et al.*, 2004). Pethe e colaboradores (2001) mostraram que uma mutação no gene *hbhA*, que codifica a adesina hemaglutinina ligadora de heparina (HBHA), em Mtb ou *M. bovis* BCG afetou a interação destas micobactérias com células epiteliais, mas não com células fagocíticas, como macrófagos. Também observaram que revestimento de cepas selvagens com anticorpos anti-HBHA prejudicou a disseminação da infecção após a administração intranasal em camundongos, fornecendo evidências de que adesinas, como HBHA, são necessárias para a disseminação extra pulmonar, e que interações com células não fagocíticas têm um papel importante na patogênese da TB; outra sugestão é que a resposta de anticorpos à HBHA pode constituir uma proteção adicional contra a tuberculose. Anticorpos específicos das classes IgG e IgA que reconhecem antígenos de Mtb têm sido relatados como presentes na secreção mucosa do trato respiratório inferior (Boyton e Openshaw,

2002). Enfim, o mecanismo exato de proteção conferida pela imunidade humoral não está completamente esclarecido, exceto pelo aprimoramento da fagocitose e apresentação de antígenos pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) (Abebe e Bjune, 2009).

### **1.6.1 Biomarcadores – Importância e Ferramenta para discriminação entre proteção, infecção e doença.**

Um marcador biológico (biomarcador) é definido como um indicador de processos biológicos normais, patogênicos, ou de respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas (Biomarkers Definition Working Group, 2001). Com relação à tuberculose, quanto mais se conhece a respeito de sua resposta imune e, particularmente, sobre as características que distinguem imunidade protetora, susceptibilidade a doença e patologia, melhor pode-se definir os biomarcadores que se correlacionam com estes diferentes estágios de infecção.

Em 2008 Jacobsen e colaboradores reportaram a importância da identificação de biomarcadores e sua aplicabilidade para a tuberculose, destacando-se:

- a) Triagem clínica de novas vacinas e candidatos a droga (Pien *et al.*, 2005; Peck, 2007);
- b) Predição da susceptibilidade à doença;
- c) Resposta ao tratamento e recuperação dos pacientes;
- d) Influência de co-infecções na tuberculose e na eficácia vacinal;
- e) Diagnóstico da tuberculose infantil.

Frente à urgente necessidade do aprimoramento de drogas e vacinas contra a tuberculose, a identificação de correlatos de proteção imune facilitará tanto o desenvolvimento quanto seus testes, reduzindo os custos com as triagens clínicas. Recentemente, foi feito um ensaio clínico randomizado para avaliar a eficácia protetora da revacinação no Brasil, sendo para isto necessário o recrutamento de mais de 200.000 crianças em idade escolar (Rodrigues *et al.* 2005). A descoberta de correlatos de proteção conferida pela vacinação poderia diminuir os custos com este tipo de ensaio e simplificaria testes com grande número de antígenos potenciais candidatos vacinais (Fletcher, 2007).

Atualmente, os biomarcadores mais amplamente utilizados como correlatos de imunidade protetora mediada por célula são o IFN $\gamma$  e a proliferação de linfócitos, apesar de limitações (Flynn, 2006). Todavia, estes, freqüentemente falham em predizer a imunidade protetora para TB em populações adultas (Flynn, 2006). Além disto, a falta de correlação entre a produção de IFN $\gamma$  pelas células T e a proteção induzida pelo BCG (Mittrucker *et al.*, 2007), fazem com que biomarcadores adicionais sejam requeridos para uma correlação de proteção mais confiável.

Alguns trabalhos utilizando modelos animais têm proposto biomarcadores de proteção induzida pela vacinação contra TB. Entretanto, estes freqüentemente não são prognósticos da imunidade humana para TB. Portanto, não existe até o momento, nenhum correlato de proteção induzida pela vacina BCG contra TB. (Buddle *et al.* 2003; Hoft *et al.*, 2002 e Kaufmann, 2001).

Até o momento, nenhum dos antígenos micobacterianos identificados parece, por si só, oferecer a especificidade e sensibilidade desejadas para potenciais biomarcadores, porém um coquetel de antígenos poderia ser capaz de atuar como tal. O complexo antigênico formado pelas proteínas Mpt64, TrxC, HspX e antígeno de 38 kDa, é um exemplo desta aplicabilidade. Este complexo foi capaz de diferenciar pacientes com a forma cavitária e não cavitária da TB com razoável acurácia, através da imunoproteômica (Sartain *et al.*, 2006). No entanto, a heterogeneidade da genética populacional, do agente etiológico predominante e a variabilidade de vacinas BCG utilizadas em todo mundo devem ser considerados durante a seleção de um correlato de proteção. No Brasil, a vacina empregada, BCG Moreau, expressa, por exemplo, a proteína Mpt64; logo, a utilização deste coquetel em brasileiros vacinados pode levar a resultados falso-positivos para a infecção por TB. Portanto, um estudo buscando possíveis biomarcadores de proteção oferecida pela vacina BCG Moreau deve ser realizado na população vacinada com a mesma. O Brasil constitui um bom local de estudo, visto que esta foi a única vacina contra a TB administrada até os dias de hoje.

## 1.7 *Mycobacterium bovis* BCG: a única vacina disponível contra Tuberculose

### 1.7.1 Breve histórico

A vacina BCG é a única disponível contra a tuberculose. Foi desenvolvida no Instituto Pasteur de Lille por Albert Calmette e Camille Guérin, durante a tentativa de obter culturas homogêneas de *Mycobacterium bovis* (virulento), isolado em 1902 do leite de uma vaca com mastite tuberculosa. Ao final de 13 anos (1908-1921), após 230 passagens sucessivas *in vitro* da amostra de *M. bovis* cultivada em meio contendo bile bovina, Calmette e Guerin obtiveram um organismo mutante, no qual foram observadas alterações morfológicas das colônias e perda gradual da virulência. Esta amostra atenuada foi batizada como BCG (Bacilo de Calmette e Guérin), e foi utilizado com sucesso na imunização ativa de vacas, sem produzir a doença (Sakula, 1983). Em julho de 1921, a vacina foi administrada pela primeira vez em humanos. Um bebê que a mãe faleceu de tuberculose poucas horas após o parto, recebeu três doses da vacina via oral (Bonah, 2005), não apresentou efeitos colaterais deletérios e mais importante, não desenvolveu tuberculose.

Em 1924, o Instituto Pasteur distribuiu as culturas de BCG para laboratórios em todo o mundo (Oettinger *et al.*, 1999). Por tratar-se de uma vacina viva, apesar dos esforços para padronização do crescimento e preparação da vacina, diferentes condições de passagem foram utilizadas nos diferentes laboratórios de produção e a evolução *in vitro* do BCG prosseguiu. Emergiram diversas sub-cepas distintas, incluindo a BCG Moreau que é a vacina administrada no Brasil.

Desde 1974, o BCG foi incluído no Programa Expandido de Imunização da OMS (WHO, 2005). Assim, estima-se que mais de 3 milhões de indivíduos tenham sido imunizados com o BCG, sendo mais de 100 milhões de doses administradas anualmente, tornando-a a vacina mais usada mundialmente em humanos. Estudos de meta-análise confirmaram que o BCG protege crianças, com eficácia superior a 80%, contra as formas graves da tuberculose, incluindo meningoencefalite tuberculosa e tuberculose miliar (Colditz *et al.*, 1995, Trunz, Fine, Dye, 2006). Em contrapartida, a proteção contra a forma pulmonar da tuberculose em adolescentes e adultos varia de 0 a 80%, dependendo do estudo (Brewer, 2000, Colditz *et al.*, 1994). A razão para a eficácia variável da vacina BCG é ainda desconhecida, mas várias hipóteses são propostas, incluindo diferenças entre cepas de BCG utilizadas nos vários países, divergências na dose e via de administração, idade da vacinação,

exposição prévia à micobactérias ambientais, diferenças na cepa de *M. tuberculosis* infectante e fatores genéticos inerentes às diferentes populações vacinadas. Além disto, diferenças na resposta imune geneticamente determinada, fatores nutricionais e infecção por helmintos também estão associadas à variabilidade de proteção (Colditz *et al.*, 1995, Fine, 1995, Fine *et al.*, 1999).

### 1.7.2 Genealogia das vacinas BCG – Diferentes BCGs diferentes vacinas

Na tentativa de compreender a evolução, atenuação e a variabilidade protetora das sub-cepas de BCG foi feito um estudo de genômica comparativa que revelou a ocorrência de numerosas mutações genéticas, incluindo polimorfismos de base única, duplicações e deleções (Behr, 1999). O impacto das diferenças genéticas no fenótipo das diferentes sub-cepas de BCG tem contribuído para o melhor entendimento da eficácia protetora variável observada nestas vacinas BCG.

Pode-se dizer que as vacinas BCG atualmente disponíveis tiveram duas fases de atenuação. A primeira, entre 1908-1921, período no qual ocorreu a atenuação da cepa de *M. bovis* após 230 passagens *in vitro* realizadas por Calmette e Guérin. A segunda fase foi iniciada por volta de 1924, com a distribuição mundial da vacina BCG. Esta fase foi concluída várias décadas depois, e após centenas de passagens mais tarde com a criação dos lotes sementes. Como consequência da fase inicial, as cepas de BCG partilham mutações em comum, enquanto que a segunda fase resultou em mutações adicionais cepa-específicas. Em outras palavras, as cepas de BCG atualmente disponíveis apresentam mecanismos adicionais distintos de atenuação. Assim, é essencial considerar a virulência, a eficácia e os mecanismos de atenuação dentro do contexto de cada cepa de BCG (Liu *et al.*, 2009).

Behr e colaboradores (1999) através de experimentos de hibridação comparativa usando microarranjos de DNA avaliaram a diversidade genômica entre diferentes cepas de BCG. Estes estudos identificaram Regiões de Diferenças (RD) ausentes nas cepas vacinais, todavia presentes nas amostras virulentas de *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Ao todo foram relatadas 16 RDs (RD1-RD16) (Figura 1.3). A RD1 é preservada em MTb e *M. bovis* mas foi perdida por todas as cepas de BCG. Sabe-se atualmente que a perda desta região foi fundamental para a atenuação inicial da cepa de *M. bovis* (Mahairas *et al.*, 1996, Behr e Sherman, 2007), entretanto sua reintrodução no BCG não restaurou completamente a virulência, o que indica que esta região não é a única responsável pela virulência de MTb e *M. bovis* (Pym



*et al.*, 2003). O *locus* RD1 compreende 9 genes (*rv3871-rv3879c*) incluindo os genes que codificam as proteínas secretadas CFP10 (Berthet *et al.*, 1998) e ESAT-6, (Sorensen *et al.*, 1995).

Outra região de deleção observada nas cepas de BCG derivadas após 1927 é a região RD2. Esta região está presente nas cepas mais antigas, como por exemplo, BCG Moreau. Nesta região estão presentes os genes *rv1980c* e *rv1984c* que codificam respectivamente as proteínas Mpt64 e Cfp21.

Algumas RDs são específicas de uma dada cepa vacinal. A RD8 está ausente nas cepas BCG Canadá, Frappier e Connaught; já as RD14 e RD16 estão deletadas em BCG Pasteur e Moreau, respectivamente. A RD14 possui 9,1 kb contendo 10 genes (*rv1765 – rv1773*); a deleção do gene *rv1773*, um provável repressor transcricional, resulta na elevada expressão do operon *rv1774-rv1775* (Alexander e Behr, 2007). Brosch e colaboradores (2007) por análise genômica e transcriptômica da cepa BCG Pasteur 1173P observaram que seu genoma possui 3954 genes codificadores de proteínas, 58 das quais estão presentes em 2 cópias resultantes de duas duplicações em blocos independentes, DU1 e DU2. A DU1 é restrita a BCG Pasteur. A segunda região de duplicação DU-2 apresenta quatro formas; DU2-I está presente apenas nas BCG antigas (antes de 1927), como BCG Moreau, a DU2-II encontrada somente nas BCGs Sweeden e Birkhaug, enquanto as DU2-III e -IV ocorrem nas vacinas mais novas (após 1927).

A RD16, ausente exclusivamente em BCG Moreau, apresenta 7.608 pb e possui 6 fases abertas de leitura: *rv3400 – rv3405c*. O gene *rv3405c* codifica para um regulador transcricional do tipo TetR (Ramos *et al.*, 2005).

Além das RDs, mutações pontuais em genes específicos foram observadas, uma delas ocorre no gene *sigK* (Charlet *et al.*, 2005) que regula a expressão das proteínas imunogênicas secretadas Mpt70 e Mpt83. Outra mutação pontual ocorreu no gene *mmaA3* (Behr *et al.*, 2000) e está relacionada à produção defeituosa de uma subclasse de ácidos micólicos de parede celular chamados de metoximicolatos (Milstien e Gibson, 1990). Leung e colaboradores (2008) reportaram que todas as amostras distribuídas até 1925 possuem uma segunda cópia do elemento de inserção IS6110, inserido na região promotora do gene *phoP*, um regulador que medeia a expressão de múltiplos genes, inclusive genes do sistema de secreção ESX-1 (Lee *et al.*, 2008).

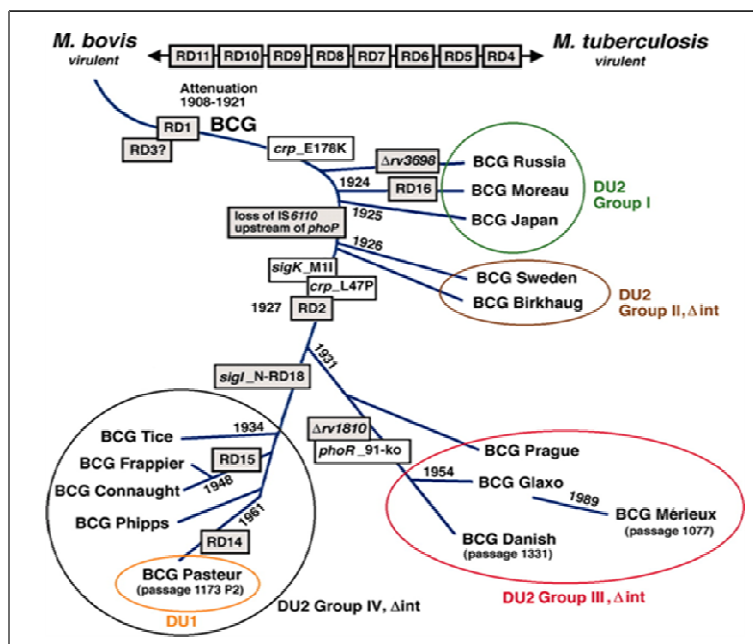


Figura 1.3: Genealogia das vacinas BCG. O esquema apresenta polimorfismo de marcadores genéticos, regiões de diferença (RD), deleções cepa-específicas e a distribuição das vacinas em quatro grupos, de acordo com o tipo de duplicação (DU). Adaptado de Brosch *et al.*, 2007.

As diferenças genômicas observadas entre as diversas vacinas BCG se reflete na resposta imune induzida pelas mesmas. Com base nas diferenças apontadas acima seria esperado que as cepas de BCG mais “antigas” fossem mais virulentas e mais imunogênicas, protegendo de forma mais eficiente quando comparadas às cepas de BCG mais “recentes”. Ritz e colaboradores (2008) revisaram criticamente os dados de estudos com animais e humanos vacinados com diferentes cepas de BCG. Embora haja boas evidências de que a resposta imune induzida e a proteção oferecida contra a tuberculose sejam distintas entre as diferentes vacinas BCG, atualmente não há dados suficientes que favoreçam ou recomendem uma cepa vacinal em particular. A questão fundamental é se essas diferenças constatadas em modelos experimentais traduzem-se nas mesmas diferenças quanto à eficácia protetora contra a tuberculose em humanos.

Hayashi e colaboradores (2009) avaliaram a atividade imunoestimulatória de 14 cepas de BCG frente à linhagem de células humanas (epiteliais A549 e mielóides THP-1) e células da medula óssea de camundongos, na presença de  $IFN\gamma$ . Neste trabalho foi observado que as cepas mais próximas da original (Rússia, Moreau, Japão, Suécia, Birkhaug), capazes de sintetizar os três tipos de micolatos ( $\alpha$ , metóxi e ceto) na parede celular, apresentaram indução mais forte de óxido nítrico, interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , do que

as cepas de BCG distribuídas após 1927 (Dinamarquesa, Glaxo, México, Tice, Connaught, Montreal, Phipps, Austrália, Pasteur). Este estudo fornece informações básicas para a caracterização imunológica das diferentes cepas de BCG, e pode contribuir para uma re-avaliação das mesmas na tentativa de identificar uma cepa de referência para a vacinação contra a tuberculose.

Assim, estudos bem delineados são urgentemente necessários para comparar a resposta imune induzida por diferentes cepas da vacina BCG em humanos. Em particular, comparando cepas geneticamente distantes. Este tipo de avaliação exigirá também uma melhor compreensão *in vitro* dos correlatos da imunidade protetora contra a tuberculose. Uma melhor aplicabilidade das vacinas BCG existentes poderia desempenhar um papel importante no Plano Global da OMS de estratégia para o combate da tuberculose (Ritz *et al.*, 2008).

### 1.7.3 O uso Mundial das diferentes BCG

Ritz e Curtis (2009) revisaram dados da OMS/UNICEF e confeccionaram o primeiro mapa (figura 1.4) mostrando as cepas vacinais de BCG utilizadas globalmente. Tal estudo é importante para a interpretação das modificações epidemiológicas, dos possíveis efeitos adversos decorrentes da administração do BCG, das diferenças na eficácia protetora da vacina, e para a concepção de estudos que investiguem novas vacinas contra a tuberculose.

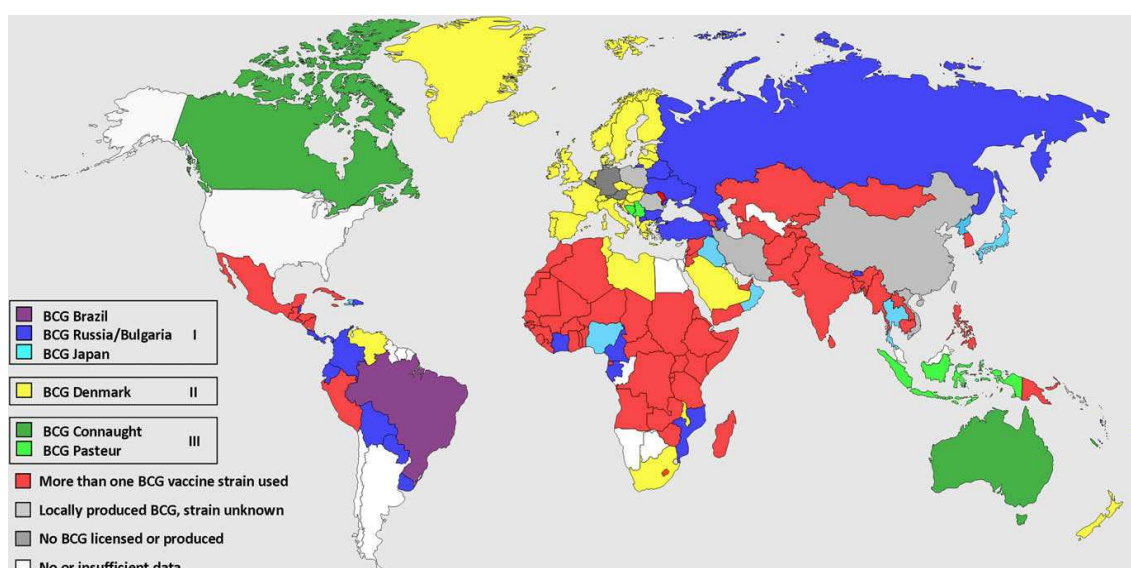


Figura 1.4: Cepas da vacina BCG utilizadas entre 2003 e 2007 em todo o mundo. As vacinas BCG agrupadas numa mesma caixa são geneticamente mais similares. A caixa I inclui cepas de BCG obtidas do Instituto Pasteur, antes de 1926. As caixas II III são variedades obtidas em datas posteriores (Adaptado de Ritz e Curtis, 2009).

### 1.7.4 Novas vacinas contra tuberculose

Dada a variabilidade da eficácia protetora da vacina BCG, novas vacinas contra a tuberculose encontram-se em diferentes estágios de pesquisa, na busca por um aprimoramento ou mesmo substituição da vacina atualmente utilizada.

Diferentes conceitos têm sido utilizados para o desenvolvimento destas novas vacinas, tais como: atenuação do *M. tuberculosis* (Pinto *et al.*, 2004); vacinas de subunidade, como ESAT 6 (Agger e Andersen, 2002); co-imunização utilizando BCG e plasmídeo codificando IL-12 (Britton e Palendira, 2003); vacinas de DNA que codificam a expressão de proteínas antigênicas, como Hsp60, Ag85B ou Hsp65, (Britton e Palendir, 2003; Silva *et al.*, 1994; Lowrie, Tascon e Silva, 1995). A Figura 1.5 mostra alguns destes candidatos vacinais e suas fases de desenvolvimento.

	Antígeno	Administração	Fase de desenvolvimento
<i>Mycobacterium vaccae</i>	Suspensão integral de <i>M. vaccae</i> morto	Lisado de micobactéria atípica administrado ID a indivíduos HIV+ como <i>boost</i> de imunidade previamente induzida por BCG	Fase III em andamento na Tanzânia
MVA/Ag85A recombinante	Ag85A*	Vacina recombinante viva ou não-replicativa administrada IM como <i>boost</i> após BCG	Fase II
BCG30 recombinante	Ag85B*	BCG recombinante administrado ID (substituição potencial para BCG WT)	Fase I terminada
MTB72f	Fusão entre MTB32 <sup>1</sup> e MTB39 <sup>2</sup>	Proteína de fusão recombinante administrada IM com adjuvante	Fase I terminada
Híbrido 1	Fusão entre Ag85B e ESAT-6 <sup>3</sup>	Proteína de fusão recombinante administrada IM com adjuvante	Fase I
BCG <i>AureC hly+</i> recombinante	Todos os antígenos expressos por cepas BCG padrão	BCG recombinante administrado ID e modificado de forma a escapar do fagolisossoma para melhor indução de CD8+ CTL	Etapas finais de ensaios pré-clínicos
AERAS-402	Ag85A+B, TB10.4	Adenovirus recombinante, não replicativo, administrado IM	Fase I

ID = via intradérmica; MVA = vírus vaccínia Ankara modificado. Ag = antígeno. IM = via intramuscular. WT = selvagem. CTL = linfócito T citotóxico. \* Antígeno secretado. <sup>1</sup>Serino protease. <sup>2</sup>Proteína da família PPE. <sup>3</sup>Early Secreted Antigen.

Figura 1.5: Antígenos e vacinas candidatas para o combate à tuberculose, em estágios avançados de desenvolvimento. (Hoft, 2008)

#### 1.7.5 A cepa vacinal brasileira: *M. bovis* BCG Moreau e o esquema vacinal

Na distribuição das amostras de BCG pelo Instituto Pasteur, chegou ao Brasil, em 1925, por intermédio do médico uruguaio Júlio Elvio Moreau, a amostra que foi denominada BCG Moreau, e foi entregue ao pesquisador Arlindo de Assis, no Rio de Janeiro.

Até 1930, a vacina BCG era produzida por Arlindo de Assis no Instituto Vital Brasil, em Niterói. Atualmente esta produção é realizada pela Fundação Atauilho de Paiva (FAP) que responde por 5% da produção mundial de BCG (Benévolo-de-Andrade *et al.*, 2005).

Quanto ao esquema de vacinação, em 1929, três doses orais eram dadas em dias alternados, dentro dos dez primeiros dias após o nascimento. Após 1973, a via de administração oral foi substituída pela intradérmica. A partir de 1977, a Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária (DNPS) recomendou a vacinação de recém-natos por esta via e a revacinação em idade escolar. Este esquema vacinal perdurou até 1982, quando foi estabelecida uma única dose para recém-natos e encerrada a revacinação (Gerhardt *et al.*, 1988). No entanto, hoje no Brasil os procedimentos de revacinação são variáveis nos diferentes estados. Rodrigues e colaboradores (2005) avaliaram a eficácia da revacinação em crianças de 7 a 14 anos, em duas cidades brasileiras (Salvador, BA e Manaus, AM) com diferentes níveis de exposição à micobactérias ambientais e com prevalência representativa da tuberculose, concluindo que a revacinação nesta idade não conferiu proteção adicional substancial em termos de saúde pública e, portanto, não deveria ser recomendada. Este estudo fornece informações que corroboram com as recomendações da OMS.

Os profissionais de saúde estão constantemente expostos ao risco de contrair tuberculose, a qual apresenta maior incidência entre estes profissionais do que os de outras áreas. Surtos de tuberculose entre pacientes e profissionais de saúde têm sido relatados, e algumas vezes associados a cepas multi-droga resistentes (Jereb *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 2005, Franco e Zanetta, 2006). No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda a vacinação de profissionais de saúde que atendem a pacientes com TB e hanseníase e que apresentem PPD negativo, com ou sem cicatriz vacinal (Ministério da Saúde, 1994; 2002)

#### **1.7.6 Resposta imune induzida pela vacina**

É mundialmente aceito que a indução de linfócitos T<sub>H1</sub> é essencial para o desenvolvimento da imunidade contra a tuberculose. Todavia a eficácia protetora da vacina BCG em adultos é bastante controversa. Como a proteção oferecida pela vacinação declina 10 -15 anos após a vacinação primária com BCG (Weir *et al.*,

2008) alguns autores acreditam que a revacinação de adultos é prudente para prevenção da tuberculose (Brooks *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2003). Após a vacinação, células T<sub>H</sub>1 efectoras induzidas migram até o sítio de vacinação e ativam macrófagos via moléculas efectoras, como IFN $\gamma$  e fator de necrose tumoral (TNF), a fim de eliminar as células infectadas pelo BCG e reduzir o número destas (Dalton *et al.*, 2000). Todavia, após a eliminação do BCG, o restante de células T<sub>H</sub>1 permanece no tecido linfóide periférico como células de memória. Uma vez que o *M. bovis* BCG e o *M. tuberculosis* são intimamente relacionados entre si, é provável que as células T<sub>H</sub>1 de memória induzidas por antígenos de *M. bovis* BCG após a vacinação, sejam capazes de proteger o hospedeiro contra a tuberculose.

Oliveira (2009), ao investigar o perfil de citocinas induzidas após revacinação de estudantes da área de saúde (PPD negativos) com BCG Moreau verificou que o pico máximo da produção de IFN $\gamma$  em culturas de sangue total, ao serem estimuladas por PPD, ocorreu cerca de 2 meses após a revacinação, indicando completa indução da imunidade celular. Um estudo prévio similar, ao analisar o efeito da revacinação com BCG Japão também encontrou o mesmo tempo (2 meses) para indução da resposta celular (Nabeshima *et al.*, 2005). Ambos os trabalhos não demonstraram a eficácia protetora oferecida pela revacinação com BCG, mas sim a reatividade do PBMC ao PPD após a revacinação com BCG. Embora o IFN- $\gamma$  seja freqüentemente utilizado como correlato de proteção contra a tuberculose, ainda não há relatos na literatura que confirmem que a produção de IFN $\gamma$  efetivamente reflita a imunidade protetora à tuberculose.

## 1.8 Proteínas extracelulares e seu envolvimento imunológico

Assim como para outros patógenos intracelulares, as proteínas exportadas por MTb são as primeiras moléculas a interagirem com o sistema imune do hospedeiro, sendo provavelmente determinantes para a virulência, possivelmente por modularem, em benefício do patógeno, o ambiente hostil do macrófago. Nesta situação intracelular, a superfície externa micobacteriana está em contato direto com a membrana interna do fagossoma, sendo este ainda capaz de fusionar com vesículas endocíticas, exportando e adquirindo novos constituintes. A modulação das funções celulares da célula hospedeira é um processo dinâmico, que requer bactérias viáveis, sustentando à idéia de que os componentes ativamente

secretados pela bactéria viva são os principais atores envolvidos neste processo. A ação imunomodulatória de proteínas secretadas por este microorganismo pode ser simplificada na figura 1.6, que mostra a ativação de um conjunto de células do sistema imune a partir destes antígenos secretados, contribuindo para o *clearence* de *M. tuberculosis* (Trajkovic, Natarajan e Sharma, 2004). A compreensão dos mecanismos de sobrevivência intracelular poderia certamente contribuir para o desenvolvimento de novos alvos para o controle e erradicação da tuberculose. Esta compreensão certamente envolve a identificação funcional e imunológica de proteínas ativamente secretadas e localizadas na superfície micobacteriana. Diversos trabalhos descritos na literatura têm mostrado que o filtrado de culturas do bacilo da tuberculose pode ser uma fonte de antígenos em potencial para o desenvolvimento de novas vacinas contra a tuberculose (Mollenkopf *et al.*, 2001). Além disso, a eficácia imunoprotetora de proteínas do sobrenadante de cultura de MTb tem sido descrita em diferentes modelos de animais infectados (Pal e Horwitz, 1992; Derrick *et al.*, 2008).

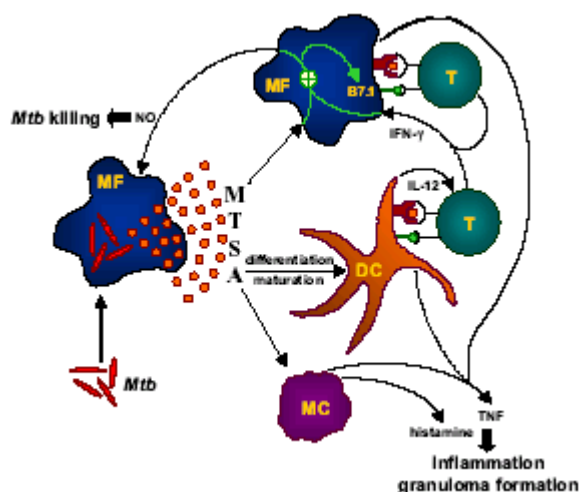


Figura 1.6: Ação imunomodulatória protetora dos antígenos secretados de *M. tuberculosis* durante a infecção por este patógeno (Trajkovic *et al.*, 2004).

O cultivo de *M. tuberculosis in vitro* resulta no acúmulo de centenas de diferentes tipos de proteínas extracelulares coletivamente denominadas de proteínas de filtrado de cultura. Seibert e Munday (1932) foram os primeiros a caracterizar bioquimicamente esta fração, e a fornecer evidências do seu envolvimento na resposta imune protetora. Uma caracterização mais extensa das proteínas de filtrado de cultura do *M. tuberculosis* foi efetuada por Nagai e colaboradores (1991), que purificaram 12 proteínas principais, caracterizando e

mapeando-as parcialmente através da eletroforese bidimensional (2DE PAGE). Adicionalmente, várias outras proteínas, especialmente as definidas pela reatividade com anticorpos monoclonais, também foram identificadas em preparações de filtrado de cultura (Khanolkar-Young *et al.*, 1992). A resposta humoral contra estas proteínas já foi reportada (Laal *et al.*, 1997), e antígenos como o 45-kDa, Mpt32 (Espitia *et al.*, 1995), o homólogo PstS de 38-kDa (Bothamely *et al.*, 1992), e o complexo protéico de 88-kDa (Ag 88kDa) (Laal *et al.*, 1997) são considerados como promissoras ferramentas para sorodiagnóstico.

A necessidade da seleção de antígenos baseada na habilidade dos mesmos em estimular o sistema imunológico humano é evidente, uma vez que antígenos e epítopos reconhecidos durante a infecção natural em humanos diferem substancialmente daqueles reconhecidos por anticorpos de animais imunizados artificialmente (Laal *et al.*, 1991; Calle *et al.*, 1992; Verbon, 1994).

Baseado nesta hipótese, Rani e colaboradores (2005) avaliaram o filtrado de cultura de BCG quanto a sua especificidade e sensibilidade para identificação de crianças vacinadas com BCG, e reportaram a presença de anticorpos IgG específicos contra antígenos presentes no filtrado de cultura. O título destes anticorpos era significativamente maior que o observado para os antígenos presentes no lisado celular, confirmando a hipótese de que as proteínas secretadas induzem fortemente a formação de anticorpos específicos.

Os sistemas ou vias responsáveis pela secreção de proteínas são críticos não só para a exportação das mesmas, mas também para a virulência do microorganismo (Finlay e Falkow, 1997). Uma destas vias é o sistema de exportação de proteínas Sec-dependente, conservado em todas as bactérias, que exporta proteínas desenoveladas, através da membrana, contendo peptídeo sinal (Danese e Silhavy, 1998). Outra via de secreção é o transportador *twin*-arginina (Sec-independente) que transloca proteínas enoveladas através da membrana plasmática (Dilks *et al.*, 2003). Além destes, é descrito também o sistema de secreção chamado ESX-1, cuja identificação ocorreu em função do interesse sobre a região RD1 que, como descrito anteriormente, codifica entre outras as proteínas ESAT-6 e CFP-10, ativamente secretadas e envolvidas na virulência (Stanley *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003; Guinn *et al.*, 2004). Todavia, tanto a ESAT-6 como a CFP-10 carecem de uma seqüência sinal de secreção distinguível, o que sugere a ocorrência de um mecanismo de secreção especializado. A primeira evidência



experimental sobre este sistema foi obtida quando a cepa vacinal BCG foi complementada com a RD1; estudos adicionais demonstraram que a região RD1 codifica diversos genes essenciais para o funcionamento do sistema ESX-1, intitulado sistema de secreção tipo VII. A carência de dados estruturais dificulta a compreensão exata dos mecanismos envolvidos neste novo sistema de secreção, no entanto já foi demonstrada a co-dependência de uma proteína em relação à outra (Abdallah *et al.*, 2007).

As proteínas de superfície, como as presentes no filtrado de cultura, também têm acesso direto ao hospedeiro independente da lise celular (Abdallah *et al.*, 2007). São importantes para a ativação primária do sistema imune do hospedeiro e vêm sendo sugeridas como alvos importantes na fase inicial da infecção por MTb. Além disso, parecem envolvidas na comunicação bactéria-hospedeiro, atuando na modulação da resposta imune, inclusive na resposta físico-química ao ambiente, facilitando o acesso de nutrientes ao interior da célula, removendo produtos tóxicos, e desempenhando papel crucial na patogenicidade através da mobilidade, colonização e aderência às células hospedeiras. Portanto, constituem potenciais alvos para drogas ou base para novas vacinas contra tuberculose (Cordwell, 2006; Flynn e Chan, 2001; Pehler *et al.*, 2000; Skeiky e Sadoff, 2006).

### **1.9 Proteoma e Imunoproteoma como ferramentas para avaliação da resposta humoral**

O conjunto de proteínas codificadas pelo genoma de um organismo pode ser descrito como proteoma (Wasinger *et al.*, 1995). A análise proteômica constitui uma poderosa abordagem para resolução e identificação de proteínas presentes em amostras biológicas complexas (Wu, Wang e Peng, 2004; Liska e Schevchenko, 2003; Xiong *et al.*, 2003). Tal tecnologia pode ser usada tanto para avaliar a variabilidade do mapa proteômico como associar determinados padrões protéicos a determinadas patologias. Além disso, mesmo para os organismos que possuem o genoma completamente seqüenciado, é a tecnologia proteômica que assegura a compreensão das relações existentes entre o genótipo e o fenótipo.

Uma estratégia para a identificação de proteínas imunologicamente relevantes é o imunoproteoma, que pode ser definido como a combinação da proteômica com uma apresentação imunológica dos dados. Para uma análise sorológica, após uma resposta imunológica específica, é necessário estabelecer o

repertório de antígenos a serem avaliados. Dentre as técnicas proteômicas atualmente disponíveis (Steel *et al.* 2005), a eletroforese bidimensional (2-DE) combinada ao *Western blot* (WB) tem sido freqüentemente escolhida como ferramenta em aplicações imunoproteômicas, caracterizando o repertório antigênico baseado no ponto isoelétrico (pI), massa relativa e reatividade do anticorpo (Klade, 2002).

A caracterização de soros provenientes de indivíduos vacinados muitas vezes revela diferentes padrões de reconhecimento (sorotipos) que podem ser indicativos de diferentes graus de proteção que a vacina confere a uma população heterogênea. Durante as fases de testes de uma vacina, é indispensável classificar os diferentes sorotipos e a distribuição destes na população, a fim de avaliar a eficácia da nova vacina contra o alvo patogênico (Kyaw *et al.*, 2000). Ademais, estudos imunológicos comparativos podem fornecer a identificação de alvos comuns entre os indivíduos de uma dada população, e a identificação de antígenos expressos pelo agente patogênico que sejam mais imunoreativos, para o desenvolvimento de vacinas com ampla proteção. Esta estratégia pode constituir uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de vacinas adaptadas à rápida evolução dos agentes patogênicos (Falisse-Poirrier *et al.*, 2006).

Empregando tal metodologia, Vytvytska e colaboradores (2002) identificaram potenciais candidatos vacinais, ao compararem a reatividade sorológica de indivíduos saudáveis e de pacientes com alguma forma de infecção por *S. aureus*, frente ao lisado deste microrganismo. Quinze proteínas foram identificadas e a sororeatividade destas confirmada através de ELISA e WB utilizando sua forma recombinante.

A análise imunoproteômica com soro também tem sido empregada para identificar proteínas imunoreativas em *B. anthracis* (Ariel *et al.*, 2003), *S. pneumoniae* (Ling *et al.*, 2004), *Streptococcus iniae* (Shin *et al.*, 2007) e *Mycobacterium immunogenum* (Gupta, Subramanian e Yadav, 2009).

O estudo do filtrado de cultura de *M. tuberculosis* H37Rv frente ao *pool* de soros de pacientes tuberculosos, através desta metodologia, revelou 22 proteínas sorologicamente reativas. As proteínas do complexo 85 e outras codificadas por genes localizados na RD1 foram descritas como as mais imunogênicas por apresentarem maior razão anticorpo-proteína. A ausência da RD1 na vacina BCG

torna tais antígenos promissores candidatos ao desenvolvimento de teste sorodiagnósticos para a tuberculose ativa (Malen, Softeland e Wiker, 2007).

Na busca pelo aprimoramento dos testes sorodiagnósticos para a tuberculose Samanich, Belisle e Laal (2001) avaliaram sorologicamente os antígenos do filtrado de cultura de *M. tuberculosis* H37Rv, e observaram homogeneidade na resposta humoral de pacientes com as formas cavitária e não cavitária da doença.

Desta maneira, nos propusemos a empregar a tecnologia imunoproteômica a fim de identificar antígenos extracelulares de *M. bovis* BCG Moreau (filtrado de cultura e superfície) reconhecidos por anticorpos de indivíduos PPD–negativos revacinados na idade adulta com BCG, com o objetivo de apontar possíveis correlatos de proteção contra a tuberculose, alternativos aos ensaios de IFN $\gamma$ .

## 2 Objetivos

### Objetivo geral

Analisar o perfil imunoproteômico da resposta humoral na revacinação com *M. bovis* BCG Moreau, visando identificar biomarcadores correlatos de proteção para a vacina brasileira.

### Objetivos específicos:

- ✓ Padronizar as condições ótimas para a realização dos ensaios de *Western-blot* bidimensional de proteínas extracelulares de BCG Moreau frente aos *pools* de soros dos indivíduos revacinados com esta cepa vacinal;
- ✓ Definir o perfil diferencial da resposta humoral entre os grupos de indivíduos classificados como alto e baixo produtores de IFN $\gamma$ ;
- ✓ Selecionar e identificar os antígenos extracelulares de BCG Moreau potenciais candidatos a correlatos da proteção oferecida pela vacina, associados à elevada produção de IFN $\gamma$ ;
- ✓ Avaliar a aplicabilidade dos antígenos selecionados sob a forma recombinante como potenciais correlatos de proteção frente aos soros individualizados contidos nos *pools* utilizados.

### 3 Metodologia

Os materiais empregados estão descritos no Anexo 1.

#### 3.1 Soros:

Os 94 soros utilizados neste estudo foram fornecidos pela Dra Theolis Barbosa do Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunoregulação – Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz - CPqGM/Fiocruz BA. A coleta do sangue dos indivíduos e de dados dos mesmos foi efetuada por este grupo no contexto de um projeto maior com aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM (CEPCPqGM/FIOCRUZ, Parecer nº 19/2002, anexo 2). No estudo realizado por este grupo, foram avaliados 927 estudantes universitários de duas universidades localizadas em Salvador-BA [Universidade Federal da Bahia (UFBa) e Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC)], cursando o 1º ou 2º semestre de cursos da área de saúde (medicina, enfermagem, fonoaudiologia, fisioterapia, farmácia, nutrição, odontologia), no período entre outubro de 2004 e maio de 2005. Após aplicação do Derivado Protéico Purificado do lisado de *M. tuberculosis* - teste tuberculínico (PPD RT23, cedido pela Diretoria de Vigilância Epidemiológica), os indivíduos apresentando resultado negativo (diâmetro 0 – 4 mm) foram selecionados. A prova tuberculínica foi repetida após uma semana e os indivíduos que permaneceram negativos foram divididos em 2 grupos: um grupo controle e um grupo que recebeu a revacinação intradérmica com BCG (Bacilo Calmette-Guérin, cepa Moreau, fornecida pela Fundação Ataulpho de Paiva ou pela Divisão Epidemiológica do SUS Bahia). O sangue dos voluntários foi coletado antes (T0), 2 meses (T2) e 12 meses (T12) após revacinação, como resumido no esquema da figura 3.1.

O sangue total foi utilizado para dosagem do IFN $\gamma$  na ausência ou presença de antígenos como o lisado total de *M. tuberculosis* H37Rv (10  $\mu$ g/ml), (Universidade do Colorado -EUA) ou um antígeno não relacionado (antígeno de *Dermatophagoides pteronyssinus*-Derp, 25 $\mu$ g/ml), empregando o método citométrico multi-ensaio utilizando esferas de látex (ensaio multiplex Cytometric Bead Array–Becton-Dickinson).

O resultado mostrou um aumento estatisticamente significativo nos níveis de IFN $\gamma$  nos indivíduos revacinados quando comparados aos indivíduos controles não revacinados, nos tempos 2 meses e 1 ano após revacinação. A magnitude do aumento da produção de IFN $\gamma$  em resposta ao estímulo com antígenos micobacterianos foi calculada como a razão entre os valores obtidos nas culturas antes (T0, tempo zero) e após a revacinação com BCG (T2, tempo de dois meses), para cada indivíduo. A mediana dos valores da razão T2/T0 foi de 2,784. Assim, o grupo revacinado foi subdividido em 2 subgrupos: alto responsivos (indivíduos cuja razão T2/T0 de produção de IFN $\gamma$  foi igual ou superou a mediana), e baixo responsivos (indivíduos revacinados cuja razão T2/T0 de produção de IFN $\gamma$  foi inferior a 2,784).

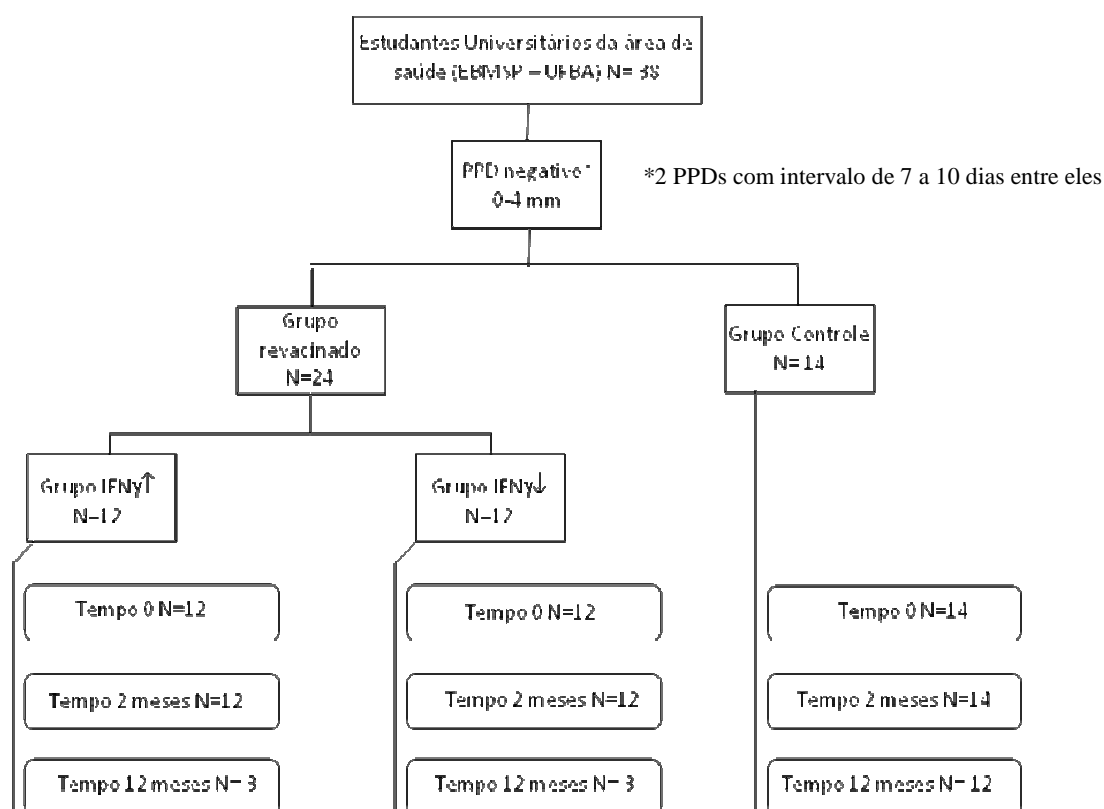


Figura 3.1: Seleção de voluntários durante a fase de aplicação e leitura do teste PPD e coleta sanguínea, nos tempos 0, após 2 meses e após 1 ano da primeira coleta

### 3.1.1 Purificação das IgGs dos *pools* de soros

Os soros foram agrupados em 9 *pools* distintos, conforme descrito na tabela 3.1.

Tabela 3.1: *Pools* de soros dos indivíduos incluídos neste estudo

<b>Grupo</b>	<b>T = 0 meses</b>	<b>T = 2 meses</b>	<b>T = 12 meses</b>
Controle	14 soros	14 soros	12 soros
IFN $\gamma$ alto	12 soros	12 soros	3 soros
IFN $\gamma$ baixo	12 soros	12 soros	3 soros

As Imunoglobulinas G (IgG) totais presentes nos *pools* de soros foram purificadas utilizando-se o kit Melon Gel IgG Purification Kit (Pierce), segundo instruções do fabricante. Em síntese, o *pool* de soros foi diluído na proporção 1:10 no tampão de purificação do Kit, e incubado na presença da resina por 5min. à temperatura ambiente sob leve agitação; após este período as IgGs foram recuperadas por centrifugação de 1min. a 4000 xg (material eluído).

## 3.2 Cepas bacterianas e plasmídeos

### 3.2.1 Cultivo de cepas bacterianas

#### *Escherichia coli*:

A cepa BL21 (*E. coli* B F- *dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal*) foi utilizada na propagação e clonagem em vetores de expressão e de seqüenciamento, sendo cultivada a 37°C por 16 horas sob agitação, em meio Luria Bertani (LB) suplementado com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, quando necessário.

#### *Mycobacterium bovis* BCG Moreau:

A cepa de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, fornecida pela Fundação Ataulpho de Paiva (FAP), foi semeada na superfície de uma batata, em meio Sauton, em tubo de Roux, e incubada por 15 dias sem agitação a 37°C. Após esse período foi feito um repique para a superfície de meio Sauton líquido, seguido de incubação a 37°C por mais 15 dias.

### 3.2.2 Plasmídeo

Para obtenção das proteínas recombinantes, utilizamos o vetor de expressão pBAD/Thio TOPO, que permite a clonagem rápida de fragmentos de DNA oriundos de reação de PCR. O gene de interesse é clonado abaixo do forte promotor induzível, pBAD, do operon arabinose de *E. coli*. As características do vetor estão resumidas abaixo:

Plasmídeo	Características	Fonte
pBAD/Thio TOPO® (4,454 kb)	Amp <sup>R</sup> , pUC <i>ori</i> ; p <sub>BAD</sub> ; <i>araC ORF</i> ; <i>tiorredoxina ORF</i> ; cauda de 6-His; sítio de clonagem TOPO®	Invitrogen

### 3.3 Obtenção das proteínas presentes no filtrado de cultura de *M. bovis* BCG

#### Moreau:

A fração de proteínas presentes no filtrado de cultura foi preparada a partir de culturas de 15 dias de BCG Moreau cultivado em meio Sauton. O sobrenadante de cultura foi separado da nata bacteriana e filtrado em membrana de 0,22 µm de baixa ligação de proteínas (0,22 µm GP Express PLUS membrane, Millipore). As proteínas presentes no filtrado de cultura foram obtidas por precipitação com ácido tricloroacético (TCA; concentração final 17% v/v), e recuperadas em tampão IEF, conforme descrito adiante.

### 3.4 Obtenção das proteínas associadas à superfície:

As proteínas associadas à superfície celular foram obtidas como descrito por Ortalo-Magné e colaboradores (1995). Em síntese, após a remoção do sobrenadante de cultura, as proteínas associadas à superfície celular foram recuperadas após vigorosa agitação manual da película bacteriana com esferas de vidro de 2 mm de diâmetro durante 45 segundos. Em seguida, o material foi recuperado em água milli-Q, centrifugado duas vezes (1500 xg por 10 minutos, à 4°C) para retirada das células bacterianas, e o sobrenadante contendo as proteínas associadas à superfície estocado a -20°C até sua utilização.

#### 3.4.1 Fracionamento com Triton X-114

Devido a natureza da amostra (fração associada, não covalentemente ligada à superfície, rica em lipídios), testamos primeiramente o fracionamento com Triton



X-114 como descrito por Cole e colaboradores (2005) visando a remoção de lipídios. Uma alíquota de 1,8 mL das amostras de superfície (obtidas conforme o item 3.4) foi centrifugada a 16.000 xg por 20 minutos e, em seguida, 1,6 mL do sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionado 400 µL de Triton X-114 na concentração final 4%, e mantido a 4°C por 16 horas com suave inversão. A seguir, o material foi incubado a 37°C por 40 minutos e centrifugado por 20 minutos a 1000 xg, obtendo-se assim a separação em duas fases, aquosa e detergente. As duas fases foram coletadas separadamente, a fase aquosa foi re-extraída com 250 µL de Triton X-114, e a fração detergente estocada a -20°C. A seguir, 400 µL da fração aquosa foram precipitados com 15% ácido tricloroacético (TCA) em acetona gelada, segundo o protocolo abaixo.

### **3.5 Precipitação de proteínas:**

A metodologia utilizada para a precipitação protéica foi adaptada a partir da descrita por Wessel e colaboradores (1984). As amostras foram descongeladas e alíquotadas em frações de 1,5 mL. As proteínas foram precipitadas pela adição TCA na concentração final de 17%,. incubação a -20°C por 10 minutos e centrifugação por 10 minutos a 16.000 xg. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado seqüencialmente com 300 µL de 1% trietanolamina (TEA) em acetona gelada e duas vezes com 300 µL de acetona 100% gelada. O sedimento final foi ressuspensão em 50 µL de tampão de focalização isoeletrica (tampão IEF).

### **3.6 Determinação da concentração protéica:**

As concentrações protéicas das amostras foram determinadas utilizando-se o kit RC-DC (BioRad) conforme especificações do fabricante. Este método é adaptado do protocolo descrito por Lowry (1951), e é compatível com agentes desnaturantes presentes no tampão IEF utilizado. O padrão utilizado para esta metodologia foi a BSA.

### **3.7 Focagem isoeletrica preparativa.**

As proteínas presentes nas amostras de filtrado de cultura e de superfície foram separadas em frações de acordo com o seu ponto isoeletrico (pI) utilizando-se o equipamento Zoom<sup>®</sup> IEF Fractionator (Invitrogen), com base no método de focalização isoeletrica preparativa em solução. Brevemente, tal tecnologia, adaptada

a partir da descrita por Zuo e Speicher (2000), consiste em uma série de câmaras adjacentes conectadas, com um volume interno de 600  $\mu$ L separadas entre si por discos de polietileno com pequenos poros, impregnados com gel de poliacrilamida 3% contendo tampões de pH específico. O pH dos discos utilizados neste estudo foi: 3,0; 4,6; 5,4; 6,2; 7,0 e 10,0 (conforme representação esquemática da figura 3.2). Esta seleção foi baseada na observação dos perfis proteômicos das proteínas de filtrado de cultura e superfície de BCG Moreau previamente obtidos no laboratório. O emprego de tal metodologia teve como objetivos: a) o aumento da concentração das proteínas dentro da faixa de pH de interesse para realização de ensaios posteriores (2-DE e *Western-Blotting* - WB), a fim de aumentar a resolução e facilitar a identificação de proteínas pouco abundantes, b) a redução da complexidade da amostra, reduzindo o alto teor lipídico presente nestas frações de micobactérias, o que prejudicaria a interpretação dos resultados dos ensaios de WB com soro humano, visto seu potencial imunogênico ( redução do *background*).

O protocolo empregado para preparo das amostras foi modificado a partir da metodologia previamente descrita na literatura (Rabilloud, 1999; Rabilloud, 2000) conforme observado no manual do fabricante. Em síntese, o volume de amostras protéicas preparado correspondeu à soma do volume interno do número de câmaras utilizadas (600  $\mu$ L X 5). No presente estudo, foi preparado 3 ml de um extrato protéico com concentração final de 3 mg/mL. O seguinte protocolo foi utilizado para o preparo de cada 1 mL das frações protéicas (superfície ou sobrenadante): às proteínas ressuspensas no tampão IEF (num volume equivalente a 1 mg/mL) foi adicionado 11,1  $\mu$ L de Tris-HCl 1M, pH 8,5 seguido de incubação por 30 min., alquilação das proteínas pela adição de 5,8  $\mu$ L de N,N-dimetilacrilamida, 99% (DMA – Sigma Aldrich) e nova incubação por 30 min. (ambas incubações realizadas à temperatura ambiente). Foram então adicionados 11,1  $\mu$ L de DTT 2M e, após cinco minutos, o sobrenadante foi recuperado após centrifugação a 16 000 xg por 20 min. Em cada uma das 5 câmaras do equipamento foram aplicados 600  $\mu$ L das frações protéicas (0,5 – 0,6 mg/mL). Imediatamente antes da aplicação adicionou-se 1% de Zoom<sup>®</sup> anfólitos carreadores pH 3,0 – 10,0 e traços do corante azul de bromofenol. A presença destes anfólitos carreadores e das membranas limites garantem que as proteínas focadas permaneçam contidas em suas respectivas câmaras até o momento de serem coletadas. Os tampões anodo e catodo formam fornecidos e preparados conforme instruções do fabricante, ambos contendo uréia e tiouréia. As condições utilizadas para a separação foram: 100 Volts

(V) por 20 min., 200V por 80 min., 600V por 80 min., perfazendo um total de 3 horas, e ao longo da focalização a amperagem máxima permitida foi de 2 mA.

Ao final do fracionamento cada câmara deverá conter apenas as proteínas com pIs entre os valores do pH dos discos limites. As cinco frações resultantes (correspondentes às faixas de pH 3,0 - 4,6; 4,6 - 5,4; 5,4 - 6,2; 6,2 - 7,0 e 7,0 - 10,0) foram recolhidas em microtubos de 2 mL. A fim de evitar contaminação cruzada e perda da amostra fracionada, as superfícies das paredes e dos discos de poliacrilamida de cada câmara foram lavadas com 200  $\mu$ L de tampão IEF por 10 min., e o lavado combinado à fração correspondente.

As proteínas presentes nas frações foram concentradas pela adição de 4 volumes de acetona 100% gelada seguido de incubação por 20 min. a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; após centrifugação a 16.000 xg por 10 min. o sobrenadante foi eliminado, o sedimento ressuspenso em tampão IEF e as proteínas dosadas pelo método RC-DC (Biorad) segundo instruções do fabricante. Estas frações foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ensaios posteriores.

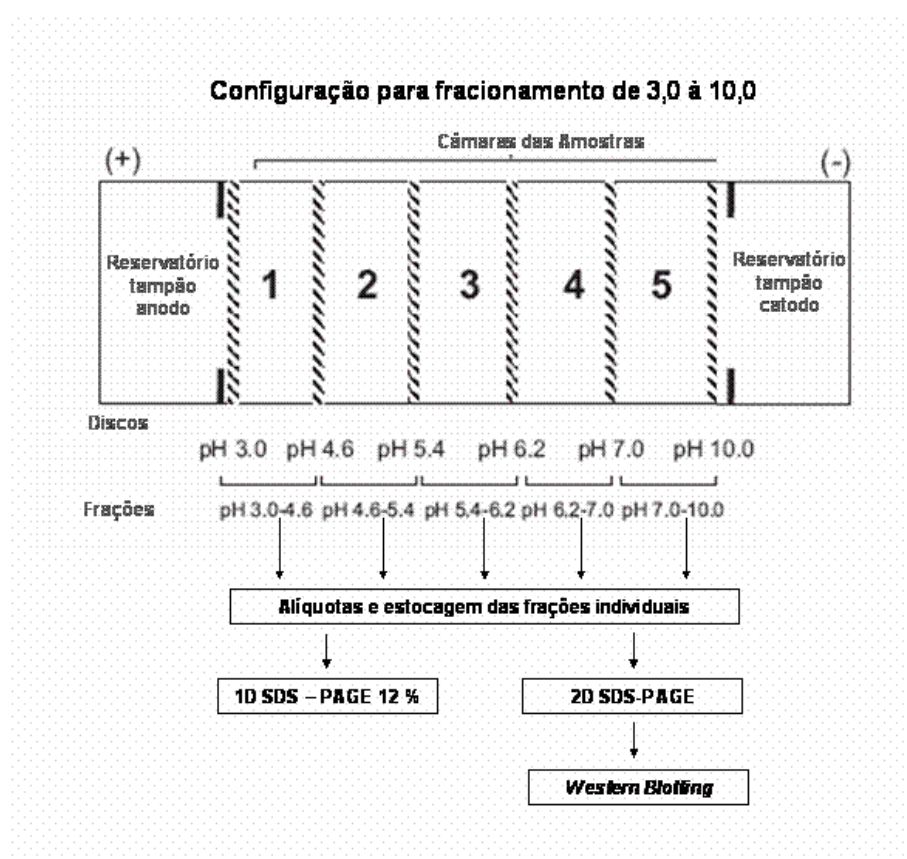


Figura 3.2. Representação esquemática do aparato Zoom<sup>®</sup> IEF *Fractionator* utilizado para o pré-fracionamento das amostras conforme o pI das proteínas em solução. Este equipamento possui 5 câmaras separadas por discos de polietileno impregnados com gel de poliacrilamida 3% com tampões responsáveis pela determinação do pH; nas extremidades esquerda e direita estão localizados os reservatórios para os tampões anodo e catodo respectivamente, onde estão localizados os eletrodos.

### **3.8. Focalização isoeétrica (1ª dimensão):**

Tiras comerciais com gradiente de pH linear imobilizado (IPG) na faixa de pH 4-7 de 7 cm de comprimento foram utilizadas para separação das proteínas conforme seu ponto isoeétrico. A rehidratação das tiras e a focalização isoeétrica ocorreram simultaneamente (rehidratação ativa) durante 18 horas, ambas realizadas à 20 °C no equipamento PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad).

#### **3.8.1 Preparo da amostra para 1ª dimensão:**

A partir de cada uma das quatro primeiras frações oriundas do Zoom® IEF Fractionator (3,0 - 4,6; 4,6 - 5,4; 5,4 - 6,2; 6,2 - 7,0) recuperou-se o volume equivalente a 25 µg de proteínas (totalizando 100 µg), ao qual adicionou-se 2,5 µL anfólitos pH 3-10 (Bio-Rad) 1% (p/v), 2,5 µL de TBP e 1 µL de azul de bromofenol 1% (p/v) em tampão IEF, para um volume final de 125 µL. Esta mistura foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente e, em seguida, aplicada sobre as tiras de IPG na cuba de focalização isoeétrica, onde foi incubada por mais 1 hora à temperatura ambiente. Passado este período a focalização isoeétrica foi iniciada. O programa utilizado foi: 11 h de rehidratação ativa (50 V); 20' a 250 V (rampa rápida); 2 h a 4000 V (rampa rápida); 4000 a 18000 V/h (rampa lenta); 5 h a 500V (rampa lenta).

### **3.9 Segunda dimensão - separação das proteínas com base no peso molecular:**

Após focalização, as tiras de IPG foram equilibradas por 10min. à temperatura ambiente, sob agitação contínua, em tampão de equilíbrio contendo uréia 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 375 mM pH 8,8, glicerol 20%, DTT 130 mM, e subseqüentemente por 10min. no mesmo tampão substituindo-se o DTT por iodoacetamida 270mM (p/v) (Biorad). Após equilíbrio, as tiras foram cuidadosamente colocadas sobre géis SDS-PAGE 12% ou 15% para a realização da segunda dimensão, conforme método descrito por Laemmli (1970). Os géis SDS-PAGE foram corridos em equipamento Mini-Protean 3 (BioRad) a 200 V até a saída do corante azul de bromofenol. Para visualização das proteínas, os géis foram corados com nitrato de prata ou Coomassie Blue (CBB) G-250 em suspensão coloidal. Como marcador de peso molecular foi utilizado o Prestained Page Ruler (Fermentas).

### 3.10 Métodos de coloração para os géis SDS-PAGE:

Para visualização das proteínas, os géis foram corados com nitrato de prata ou com Coomassie Blue G-250 em suspensão coloidal, ou por impregnação com Coomassie Blue R-250.

<u>Coloração por Nitrato de Prata</u>	<u>Tempo</u>
<u>(Método de Ansorge, 1985)</u>	
10% Etanol/5% ácido acético	10min.
2% CuCl <sub>2</sub> /12%TCA/50%Etanol	20 min.
10% Etanol/5% ácido acético	10 min.
0,01% KMnO <sub>4</sub>	10 min.
10% Etanol/5% ácido acético	10 min.
10% Etanol	10 min.
H <sub>2</sub> O	10 min.
0,1% AgNO <sub>3</sub>	10 min.
H <sub>2</sub> O	5seg.
10% K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 min.
2% K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /0,01% formaldeído	4 x 5 min.
10%EtOH/5% ácido acético	5 min.
H <sub>2</sub> O ou sol. secagem ou 1% HOAc	

No método de revelação utilizando Coomassie Brillint Blue G-250, este forma microprecipitados em meio ácido contendo sulfato de amônio. É um método sensível, capaz de detectar até 0,2 µg de proteína em cada *spot*. O processo de coloração envolve três etapas: fixação das proteínas no gel, lavagem para remoção de interferentes e a revelação das proteínas por Coomassie coloidal (adaptado de Neuhoff *et al.*, 1988).

### 3.11 Western blot bidimensional

As proteínas resolvidas em géis 1D ou 2D foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond C, GE) utilizando o equipamento Mini-Transblot (BioRad), conforme especificações do fabricante. Após a transferência, as proteínas totais foram visualizadas pela coloração da membrana com o kit Mem Code™ Reversible Protein Stain (Pierce) e a imagem capturada pelo densitômetro GS-800 (BioRad). A

membrana foi descorada e armazenada em tampão TBS contendo 0,1% Tween<sup>®</sup> 20 (tampão TBS-T) por 16 horas a 4°C. Após este período, a membrana foi bloqueada com BSA 5% em TBS-T por 2 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação. A mesma solução foi utilizada posteriormente para diluição dos soros e do anticorpo secundário. A seguir, a membrana foi incubada por 2 horas com o *pool* de soros (IgG-purificadas) de indivíduos re-vacinados ou controles na diluição 1:5000. Após lavagens sucessivas de 5 min. cada uma, 3 vezes com TBS-T e 3 vezes com TBS, passou-se à incubação com anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado à peroxidase (Pierce) por 1 hora. Todas as incubações foram efetuadas à temperatura ambiente e sob agitação. Para a revelação da reação empregou-se o kit SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce), segundo recomendações do fabricante. A imagem final foi capturada utilizando-se o densitômetro GS 800 (BioRad) e comparada à imagem das proteínas totais presentes na membrana corada com MemCode e no gel de referência corado com CBB G-250.

### 3.12 Retirada e Processamento dos *spots* protéicos:

Os *spots* protéicos de interesse foram excisados dos géis de referência e processados como descrito a seguir. Os fragmentos de gel contendo os *spots* foram descorados em solução de acetonitrila 50% (p/v) / bicarbonato de amônio 25 mM pH 8.0, através de 3 lavagens de 15 minutos sob agitação contínua. Posteriormente, os géis foram desidratados em solução de acetonitrila 100% sob agitação constante. Na etapa seguinte, utilizando-se o *Speed Vac* (Savant) por 15 minutos, a acetonitrila foi removida e os *spots* foram completamente secos. Os peptídeos foram digeridos com tripsina 20 ng/ $\mu$ L (PROMEGA) por 40 min. no gelo. Após esse tempo, todo o excesso de tripsina foi removido e foi adicionado 20 $\mu$ L de solução de bicarbonato de amônio 50 mM. Os tubos foram incubados a 37°C durante 16 h. A seguir foi feita a extração dos peptídeos com a solução de ácido trifluoracético (TFA) 5% (v/v) / acetonitrila 50% (v/v), e concentração dos mesmos no *Speed Vac*. Os peptídeos foram armazenados a -20°C para posterior dessalinização com ZipTip<sub>C18</sub> (Millipore), segundo as especificações do fabricante.

### 3.13 Identificação das proteínas por espectrometria de massas em equipamento MALDI-TOF/TOF:

A mistura de peptídeos trípticos foi analisada no espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF (4700 *Proteomics Analyser*, Applied Biosystems) na Plataforma de Espectrometria de Massas PDTIS/FIOCRUZ (Laboratório de Toxinologia, IOC). As amostras previamente dessalinizadas e concentradas foram misturadas em quantidades iguais a uma solução saturada de matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxinâmico (Sigma-Aldrich) (10 mg/ml em 50% acetonitrila (v/v) / 0,3% TFA (v/v)). Anteriormente a cada análise, o equipamento foi calibrado externamente usando-se uma mistura de peptídeos calibrantes com massas moleculares conhecidas (Applied Biosystems 4700 Proteomic Analyzer Mass Standards Kit – 4700 Cal Mix). A placa, contendo as amostras, foi analisada em modo refletor positivo. Para o modo de operação MS/MS, gerou-se fragmentação do íon precursor por PSD sem utilizar a câmara de colisão. Os resultados e arquivos tanto de dados de MS como de MS/MS foram gerados através de *software* integrado ao equipamento, o 4000 Series Explorer TM Remote Client (versão 3.0 Applied Biosystems). Para a identificação das proteínas, os arquivos foram analisados em bancos de dados disponíveis publicamente como o NCBIInr. Os programas de busca utilizados foram *Mascot* ([http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl? FORMVER=2&SEARCH=MIS](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS)) e os parâmetros de busca selecionados foram: tipo de busca-MS/MS; taxonomia: geral ; enzima: tripsina; foi padronizada duas perdas de clivagem da proteína; nenhuma modificação fixa foi avaliada; as modificações variáveis analisadas foram acetilação do N-terminal da proteína, carbamidometil-cisteína, deamidação (asparagina e glutamina), formilação do N-terminal da proteína, formação de piroglutamato (a partir de glutamina ou glutamato no N-terminal) e oxidação (metionina, histidina, triptofano); valor da massa analisada: monoisotópica; tolerância para a massa do peptídeo estipulada foi  $\pm 0.5$  Da; a tolerância para MS/MS foi  $\pm 0.5$  Da; a carga do peptídeo avaliada foi +1; instrumento utilizado- MALDI-TOF-TOF.

Os resultados positivos foram comparados com banco de dados do Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList>), BoviList (<http://genolist.pasteur.fr/BoviList/>) e com o banco de dados proteômicos do Instituto Max Planck, (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE>), o que forneceu uma maior consistência na interpretação e validação dos dados obtidos por esta análise.

### 3.14 Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes em *E. coli*:

Com base nos resultados de WB-2DE, quatro proteínas foram inicialmente selecionadas para estudos mais detalhados e expressas, sob forma recombinante, em *Escherichia coli*: GlnA1(Rv2220), Mpt64 (Rv1980), Mpt70 (Rv2875) e Mpt83 (Rv2873). A proteína Apa recombinante, também incluída neste estudo, foi gentilmente cedida pela Dra. Cynthia Horn do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) Fiocruz/RJ. Para a obtenção das formas recombinantes das proteínas, oligonucleotídeos (Tabela 3.2) para amplificação do gene de interesse foram desenhados e sintetizados.

Tabela 3.2: Oligonucleotídeos utilizados nesse estudo

Nome	Seqüência (5' – 3')
GlnA1-F	GTG ACG GAA AAG ACG CCC GAC GAC
GlnA1-R	AAC GTC GTA GTA CAG CGC GAA TTC
Mpt64-F	GCG CCC AAG ACC TAC TGC GAG
Mpt64-R	GGC CAG CAT CGA GTC GAT CGC
Mpt70-F	GGC GAT CTG GTG GGC CCG G
Mpt70-R	CGC CGG AGG CAT TAG CAC GC
Mpt83-F	GAC CCC GCA GCG GAC CTG ATT
Mpt83-R	CTG TGC CGG GGG CAT CAG CAC



### 3.14.1 Amplificação das regiões codificadoras por PCR e obtenção do fragmento de DNA para clonagem no vetor de expressão pBAD-Thio TOPO:

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 µl, utilizando o kit *High Fidelity* (Invitrogen), 200 ng de cada iniciador específico (F e R) e 5 µl de uma diluição 1:100 de DNA genômico de *M. bovis* BCG Moreau .

A ciclagem utilizada para as reações de PCR estão especificadas abaixo.

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
95°C	3 minutos	1 ciclo
95°C	30 segundos	35 ciclos
60°C*	30 segundos	
72°C	1,5 minuto	
72°C	7 minutos	1 ciclo
4°C	-----	∞

\*70°C para amplificação da região codificante para a proteína GlnA1.

Os produtos de PCR foram posteriormente analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% a 80V, em TBE 0,5X. Após a corrida, o DNA foi corado com brometo de etídeo, descorado em água destilada e visualizado sob luz U.V. em transiluminador.

#### Purificação dos produtos de PCR:

Os fragmentos de PCR resultantes correspondentes aos genes *mpt70*, *mpt64*, *mpt83* e *glna1* de *M. bovis* BCG Moreau foram purificados através da utilização do Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) segundo recomendações do fabricante.

### 3.14.2 Clonagem TOPO® TA

Para a clonagem das regiões codificantes para as proteínas selecionadas empregamos o kit "TOPO® TA Cloning" (Invitrogen) contendo o vetor de expressão pBAD/TOPO® ThioFusion (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante. A clonagem TOPO® TA é uma estratégia de clonagem rápida que dispensa o uso de T4 DNA ligase, não necessitando de longos períodos de incubação uma vez que é realizada à temperatura ambiente por no máximo 30'.

A clonagem TA utiliza a atividade terminal transferase da *Taq* DNA polimerase que adiciona uma deoxiadenosina nos terminais 3' dos produtos amplificados. O vetor linearizado fornecido no kit possui nas extremidades 3' um resíduo de deoxitimidina em fita simples, onde está acoplada a topoisomerase I através de ligação fosfodiéster. Essa topoisomerase atua como ligase catalisando a ligação entre o inserto e o vetor, após o pareamento de A=T.

H <sub>2</sub> O milli-Q autoclavada	_____	2µl
Solução de sal diluído ¼	_____	1µl
Produto do PCR purificado	_____	2µl
vetor pBAD-Thio TOPO (Invitrogen)	_____	0,5 µl

### 3.14.3 Preparo de células competentes para eletroporação:

Células da cepa BL21 de *E. coli* foram inicialmente estriadas em meio LB/Agar e incubadas a 37°C por 18 horas de modo a obter colônias isoladas. Em seguida, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB e incubada a 37°C, sob agitação, por uma noite.

Posteriormente, 2,5 mL desta cultura foram inoculados em 250 mL de LB (diluição de 1:100) e a cultura incubada a 37°C, sob agitação, por 4 horas. Após este tempo de incubação, a cultura foi mantida em banho de gelo por no mínimo 30 minutos e, em seguida, centrifugada a 3.000 xg por 15 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado três vezes, com 250 mL e 125 mL de água Milli-Q estéril e com 125 mL de glicerol 10% estéril, respectivamente, nas mesmas condições de centrifugação anteriormente descritas. Após a última lavagem, o sedimento foi concentrado 100 vezes sendo ressuspenso em 2,5 mL de glicerol 10% estéril. A suspensão bacteriana foi distribuída em alíquotas de 200 µL em microtubos, com congelamento imediato em banho de gelo seco/etanol e posterior estocagem a -70°C até o momento do uso.

#### **3.14.4 Transformação por eletroporação**

Após o tempo de incubação necessário para a ligação do inserto ao vetor, 2  $\mu$ L da reação de ligação foram utilizados para transformar 50  $\mu$ L de células eletrocompetentes, em cuvetas de 0,2 cm utilizando o eletroporador Gene Pulser (BioRad). Os parâmetros utilizados para eletroporação foram: 2,5 kV, 25 $\mu$ F e 200 $\Omega$ .

Após a eletroporação, a mistura foi imediatamente transferida para um tubo contendo 1 mL de meio LB e incubada por uma hora a 37°C sob agitação suave. Posteriormente, 100  $\mu$ l e 900  $\mu$ l da transformação foram plaqueados em meio LB/ágar/ampicilina e as placas incubadas a 37°C por 16 h.

#### **3.14.5 Indução rápida para identificação de recombinantes**

Este teste foi realizado com objetivo de identificar, rapidamente, transformantes capazes de expressar a proteína de interesse. Colônias isoladas obtidas após a transformação descrita acima foram inoculadas em 3 mL de meio LB/Amp e incubadas a 37°C por 16 horas, sob agitação. Cada cultura foi então diluída 1:100 em 1 ml de meio LB/Amp e essas culturas incubadas a 37°C sob agitação. A cultura original foi mantida a 4°C como estoque. Após o tempo de 3 horas, a expressão foi induzida pela adição de arabinose 20% (v/v) de modo a atingir uma concentração final de 0,02% (v/v) e a incubação mantida por mais 3 horas nas mesmas condições. Ao final deste tempo, as culturas foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 16500 xg por 3 min, o sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano diretamente ressuspenso em 100  $\mu$ l de tampão de amostra para SDS-PAGE. As amostras foram fervidas por 5 min, centrifugadas a 16500 xg por 1 min. e 10  $\mu$ l de cada amostra aplicado em gel SDS-PAGE. Para estocagem definitiva de cepas expressoras, a cultura original mantida a 4°C foi utilizada para crescimento de culturas-estoques e criopreservação.

#### **3.15 Teste de expressão das proteínas recombinantes**

A partir de culturas saturadas, crescidas a 37°C por 16 h, foram feitas diluições 1:100 em 20 mL de meio LB/Amp e as culturas incubadas a 37°C, sob agitação, até atingir uma DO<sub>600nm</sub> de 0,4. Neste ponto as culturas foram subdivididas em 2 frascos de 10 mL cada e a um dos frascos foi adicionada arabinose na concentração final de 0,02% (v/v); os outros 10 mL foram mantidos como controle não-induzido. As culturas foram mantidas por 18 h, e 2 amostras de 1 mL

removidas após 3 h e ao final da incubação; as bactérias foram coletadas por centrifugação, uma amostra foi mantida a  $-70^{\circ}\text{C}$  para realização do teste de solubilidade (ver item 3.15, abaixo) e o sedimento da outra amostra ressuspensa em tampão SDS-PAGE de modo a se obter o equivalente a  $0,1 \text{ DO}_{600\text{nm}}$  por  $10 \mu\text{l}$  de amostra.

### **3.15.1 Western Blot com anticorpo anti-6HIS**

Para certificarmos que os insertos clonados levavam à expressão de proteínas recombinantes com peso molecular compatível com o esperado e cauda de histidina C-terminal realizamos ensaios de WB utilizando anticorpo anti-histidina. As proteínas recombinantes resolvidas em géis SDS-PAGE foram eletro-transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham Pharmacia) em equipamento Mini Transblot (BioRad), a  $100 \text{ V}$  durante uma hora, segundo especificações do fabricante. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (Sigma) para visualização e verificação da qualidade da transferência, e em seguida bloqueada em leite  $10\%/ \text{TBS}$  por uma noite a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Após o bloqueio a membrana foi lavada com TBS 1X (3 vezes por 5 min) e, em seguida, incubada durante 2 horas, com agitação suave, com o anticorpo primário Monoclonal  $\alpha\text{-His}$  (Amersham Pharmacia Biotech) na diluição 1:2500 em leite  $5\%/ \text{TBS}$ .

A membrana foi então lavada seqüencialmente com TBS contendo  $0,1\%$  Tween 20 (3 vezes por 5 min) e TBS (3 vezes por 5 min) e então incubada por 1 h na presença do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Pierce), diluído 1:1000 em leite desnatado  $5\%/ \text{TBS}$  e novamente lavada como descrito acima.

Para revelar as membranas utilizamos o Kit Super Signal<sup>®</sup> (Pierce) conforme as instruções do fabricante.

### **3.16 Teste de solubilidade das proteínas recombinantes**

Os sedimentos obtidos após centrifugação das amostras de  $1 \text{ mL}$  de cultura (induzida; ver item 3.14.1, acima) foram ressuspensos em  $1 \text{ mL}$  de tampão de lise e transferidos para um microtubo contendo  $500 \mu\text{L}$  de pérolas de vidro de  $0,1 \text{ mm}$ . As células foram lisadas mecanicamente em equipamento Bead Beater (Biospec

Products INC.), com 3 pulsos de 1 minuto. Do lisado obtido, após decantação das pérolas de vidro, foram separados 200  $\mu$ L o qual foi chamado de lisado total (condição A); o restante (800  $\mu$ L) foi clarificado por centrifugado por 10 min (4420 xg), obtendo-se assim uma fração contendo proteínas solúveis no sobrenadante e outra fração contendo os resíduos celulares e proteínas insolúveis (em corpos de inclusão) no sedimento. As proteínas contidas no lisado total e na fração solúvel após clarificação foram precipitadas pela adição de TCA (final 17% v/v), incubação a -20°C por 10 min seguida de centrifugação por 10 min a 16500 xg. O sedimento foi lavado com acetona gelada contendo 1% trietanolamina, a seguir com acetona 100% gelada e novamente centrifugado por 5 min. As amostras (fração insolúvel após clarificação e proteínas precipitadas com TCA) foram ressuspensas em tampão SDS-PAGE para posterior análise por SDS-PAGE, mantendo-se a relação de 0,1 DO<sub>600nm</sub> da cultura original para cada 10ul de tampão.

### **3.17 Expressão e purificação das proteínas recombinantes**

#### Crescimento e Indução

Para a produção das proteínas recombinantes, uma pré-cultura saturada da cepa BL21 contendo as construções para expressão das proteínas de interesse, foi utilizada para inocular 100 mL de meio LB/Amp na diluição 1:100. A cultura foi incubada a 37°C, sob agitação, e monitoramos seu crescimento até atingir uma DO<sub>600nm</sub> de 0,4. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de arabinose 20% (v/v) de modo a atingir a concentração final de 0,02% (v/v). A cultura induzida foi mantida a 37 °C, sob agitação, por 3 horas e centrifugada a 3000 xg por 15 minutos a 4 °C; o sedimento bacteriano foi estocado a -20 °C até posterior processamento.

#### Lise celular e lavagem dos corpúsculos de inclusão

Os sedimentos obtidos após centrifugação das culturas induzidas foram ressuspensos em 20 mL de tampão de lise na presença de lisozima (concentração final 1 mg/mL), mantidos no gelo sob agitação suave, até lise total (líquido claro e viscoso), e posteriormente centrifugados 12.100 xg, 15 min à 4°C. O sedimento obtido contendo as proteínas recombinantes em corpúsculos de inclusão, foi lavado com 2 mL de solução de lavagem (contendo Triton X-100) com o auxílio de um Dounce. Este procedimento de lavagem foi repetido três vezes, com objetivo de eliminar contaminantes. Durante a última lavagem, ¼ do volume (500  $\mu$ L) foi

separado para dar prosseguimento à purificação e os  $\frac{3}{4}$  restantes estocados a -20°C. Ao final da última centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado em 500  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8 contendo 8M uréia, 0,3M NaCl e 5mM imidazol, com auxílio de um mini Dounce, para solubilização dos corpos de inclusão presentes no sedimento.

#### Purificação das proteínas em pequena escala com Ni-NTA (Níquel-Ácido Nitrilotriacético) *Magnetic Agarose Beads* (Qiagen)

A purificação das proteínas recombinantes foi efetuada empregando o sistema Ni-NTA *Magnetic Agarose Beads* (Qiagen), método rápido e versátil de purificação em micro-escala por captura de proteínas que possuem seis histidinas fusionadas à sua porção C-terminal por *beads* de agarose magnéticos. O procedimento foi adaptado a partir das instruções descritas pelo fabricante. Resumidamente, ao material obtido acima se adicionou 300  $\mu$ L da suspensão das pérolas de agarose que contêm partículas magnéticas e grupos de ácido nitrilotriacético (NTA), fortemente metal-quelantes, covalentemente ligados à sua superfície; esta mistura foi incubada sob agitação suave a temperatura ambiente por cerca de 1 h. A seguir, o tubo foi colocado no suporte que possui discos magnéticos, o qual atrai as pérolas de agarose (como mostrado no esquema da figura 3.3), onde estas são mantidas enquanto o tampão de lavagem (tampão fosfato pH 6,3) é trocado 3 vezes, e por fim as proteínas que possuem cauda de histidina são eluídas pela adição de 100  $\mu$ L do tampão de eluição (tampão fosfato pH 4,5) duas vezes. O material eluído foi avaliado por SDS-PAGE 12% e estocado a 4°C para realização posterior dos ensaios de WB.

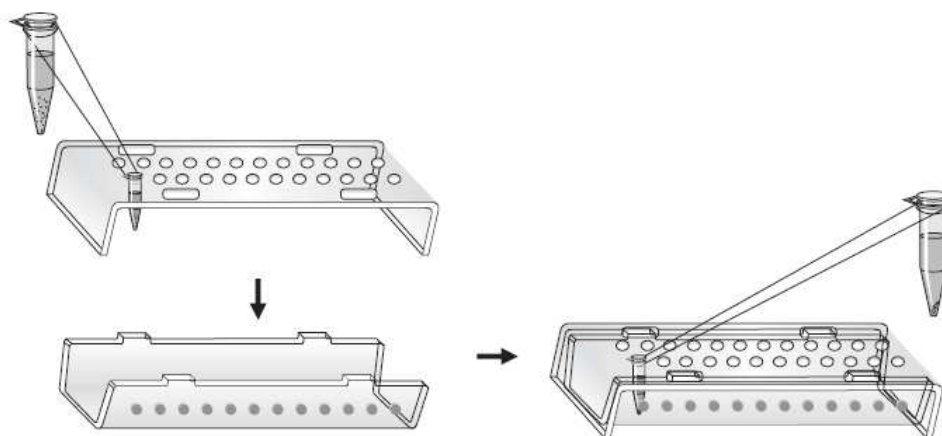


Figura 3.3: Representação do sistema NI-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen) realizado em tubos. Adaptação do manual do usuário dezembro 2001.

### **3.18 Western Blot das proteínas purificadas frente aos soros individuais**

Para a realização deste ensaio, as proteínas recombinantes purificadas foram aplicadas sob formas de linhas em membrana de nitrocelulose utilizando o equipamento Linomat IV (Camag), na concentração aproximada de 1µg/ cm. As membranas foram cortadas em tiras de 0,5 cm de largura X 10 cm de comprimento, coradas com Mem Code (Pierce) e a imagem capturada em densitômetro GS 800 (BioRad).

Para a realização dos ensaios de WB foi feita uma titulação dos soros individualizados não purificados de dois indivíduos (55 e 56), classificados como baixo e alto produtores de interferon gama, respectivamente, 2 meses após a revacinação. As diluições empregadas foram: 1:5000; 1:10000; 1:20000 e 1:40000. A diluição do anticorpo secundário foi a mesma empregada previamente, 1:100.000.

As condições de bloqueio, incubações dos anticorpos assim como as soluções empregadas foram as mesmas utilizadas para os ensaios de WB bidimensional (3.11).

## 4 Resultados

### 4.1 Padronização dos ensaios de imunoblot bidimensionais com proteínas extracelulares de *M. bovis* BCG Moreau frente ao soro humano

#### 4.1.1 *Western Blot* unidimensional

Para estudarmos o reconhecimento antigênico pelos diferentes grupos envolvidos neste trabalho, padronizamos inicialmente as condições dos ensaios de *Western blot* (WB) utilizando como fração de estudo as proteínas associadas à superfície (SF) de *M. bovis* BCG Moreau. Para isto, utilizamos o *pool* de soros de indivíduos classificados como baixos respondedores quanto à produção de IFN $\gamma$  (IFN $\gamma$ ↓), 2 meses após a revacinação.

Inicialmente, avaliamos por WB unidimensional o pré-fracionamento desta fração protéica com 4% Triton X-114, seguido de precipitação com 15% TCA/acetona, com o objetivo de remover componentes lipídicos que poderiam interferir na focalização isoeletrica e nas reações de WB, gerando alto *background*. A redução destes componentes na amostra poderia resultar em uma melhor definição do perfil de reconhecimento dos antígenos de superfície por soro humano.

Além disto, testamos duas condições de bloqueio da membrana, comparando 5% leite desnatado com 1% BSA, ambos em TBS 0,05% Tween 20. Os resultados demonstraram que o fracionamento com Triton X-114 seguido da precipitação das proteínas com 15% TCA/acetona, e bloqueio da membrana com 1% BSA, foram mais eficientes em relação tanto ao número quanto a qualidade de bandas reconhecidas pelo soro dos indivíduos (Figura 4.1).



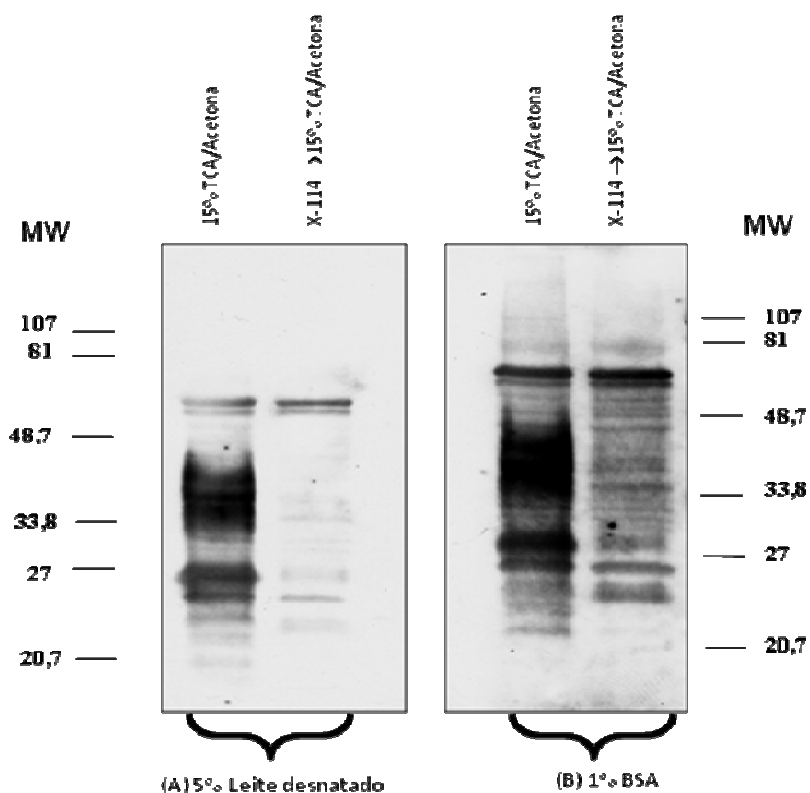


Figura 4.1: Imunoblot unidimensional (20µg) de proteínas da fração de superfície (SF) de *M. bovis* BCG Moreau pré-fracionadas ou não com Triton X-114 e precipitadas com 15% TCA/acetona, como indicado na figura. As frações foram separadas em SDS-PAGE 12%, transferidas para membrana de nitrocelulose com bloqueio em 5% leite (A) ou 1% BSA (B) e incubadas com *pool* de soros de indivíduos IFN $\gamma$ ↓ (na diluição 1:500), 2 meses após a revacinação. O *imunoblot* foi revelado com anticorpo secundário (1:100.000) conjugado à peroxidase seguido de detecção por quimioluminescência. Marcadores de peso molecular indicados na figura (MW) em kDa.

#### 4.1.2 Western Blot bidimensional (WB-2DE)

A partir dos resultados obtidos acima, procedemos à padronização dos ensaios de WB-2DE, empregando as condições ótimas observadas. Para isto utilizamos tiras de pH imobilizado na faixa de pH 3 – 10 para focalização isoeétrica e géis SDS-PAGE 12% para separação das proteínas na segunda dimensão.

Os resultados revelaram que o fracionamento com Triton X-114 (figura 4.2, painel B) não foi capaz de reduzir satisfatoriamente o *background*, quando comparado com a mesma fração protéica não fracionada (figura 4.2, painel A). Além disto, devido à manipulação excessiva da amostra, a inclusão do fracionamento com Triton X-114 resultou em uma perda da quantidade de proteínas, indicando que esta metodologia não se mostrou adequada para os ensaios de WB-2DE com a fração protéica utilizada (figura 4.2).

Apesar das condições deste ensaio não terem sido ideais, os resultados demonstraram que a maior parte das proteínas imunogênicas se concentraram na faixa de pH 4 -7, corroborando com os dados obtidos do mapa proteômico

confeccionado em nosso laboratório (Pagani, 2008), e que o reconhecimento antigênico pelo soro destes indivíduos parecia se concentrar na faixa de peso molecular entre 27 e 81 kDa (figura 4.2).

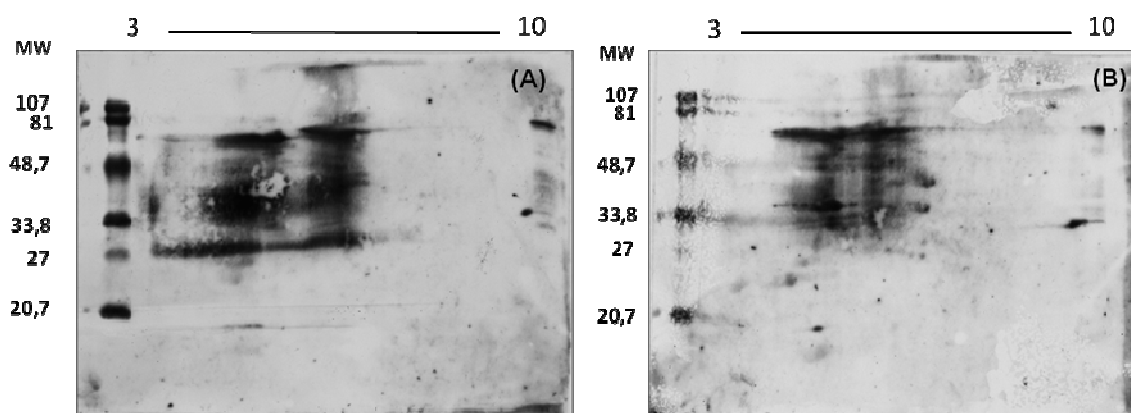


Figura 4.2: WB-2DE das proteínas da fração de superfície de *M. bovis* BCG Moreau, fracionadas (B) ou não (A) com Triton X114. A focalização isoeétrica foi realizada em tiras de pH 3-10 seguida de separação na 2ª dimensão em géis SDS-PAGE 12%; as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas em 1% BSA em TBS/ 0,05% Tween 20. As membranas foram incubadas com o *pool* de soros de indivíduos IFN $\gamma$ ↓ (1:500 em 0,1% BSA), 2 meses após a revacinação. O imunoblot foi revelado com anticorpo secundário (1:100.000) conjugado à peroxidase seguido por detecção por quimioluminescência. Marcadores de peso molecular (MW) indicados na figura em kDa.

#### 4.1.3 Padronização das condições de bloqueio para os ensaios de WB bidimensionais

Frente aos resultados anteriores optamos pela precipitação direta das amostras com 15% TCA/acetona; todavia, em função do ainda elevado *background* no WB-2DE testamos para o bloqueio diferentes concentrações de BSA (1%, 3% e 5%) e tempos de incubação (2h e 16h) e, para diluição dos anticorpos, um aumento da concentração de BSA (0,3%) e de Tween 20 (0,1%). Os resultados mostrados na figura 4.3 demonstram que a melhor condição de bloqueio foi 5 % BSA em TBS Tween 20 0,05% por 2 hs à temperatura ambiente, com diluição do *pool* de soros em 0,3% BSA em TBS/ Tween 20 0,1% (figura 4.3, painel C) quando comparado às demais condições testadas (figura 4.3, painéis A e B). Desta forma esta condição passou a ser empregada nos demais ensaios.

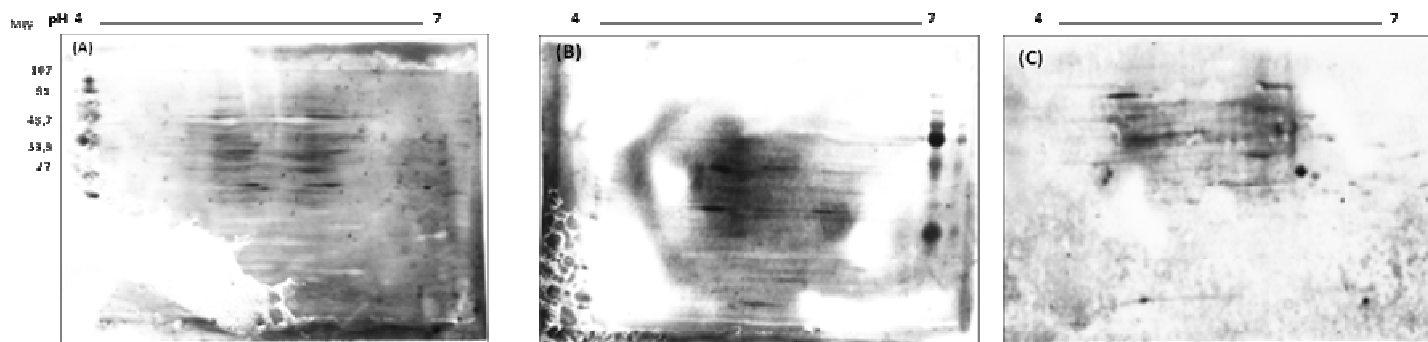


Figura 4.3: Padronização dos ensaios de WB-2DE com proteínas da fração de superfície de *M. bovis* BCG Moreau e reconhecimento por *pool* de soros de indivíduos  $\text{IFN}\gamma\downarrow$  (1:500), 2 meses após revacinação. Foram testadas diferentes condições de bloqueio das membranas e diluição dos anticorpos primários: bloqueio em BSA 1% (A) ou 3% (B) por 16 horas a 4°C e incubação com anticorpos primários diluídos em BSA 0,1% em TBS/Tween 20 0,1%, e em (C) bloqueio em BSA 5% por 2 h à temperatura ambiente e incubação com anticorpos primários diluídos em BSA 0,3% em TBS/Tween 20 0,1% (C). A focalização isoeétrica foi feita em tiras de pH 4-7 seguida de separação na 2ª dimensão em géis SDS-PAGE 12%. O anticorpo secundário conjugado à peroxidase foi utilizado na diluição 1:100.000 e a detecção foi feita por quimioluminescência. Marcadores de peso molecular (MW) indicados na figura em kDa.

#### 4.1.4 Avaliação da eficiência e reprodutibilidade da focalização isoeétrica preparativa (Zoom® IEF Fractionator)

Buscando aumentar a concentração de proteínas na faixa de interesse (pH 4-7), e reduzir a interferência de possíveis contaminantes lipídicos presentes na fração de proteínas secretadas de BCG Moreau, testamos a inclusão de uma etapa adicional na preparação das amostras utilizando o equipamento Zoom® IEF Fractionator (Invitrogen) que possibilita a focalização isoeétrica preparativa de proteínas em solução.

A eficiência e reprodutibilidade do método de focalização isoeétrica em solução em micro-escala foi rapidamente avaliada por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE 12%) de pequenas alíquotas de cada uma das 5 frações resultantes (pHs 3-4,2; 4,2-5,4; 5,4-6,2; 6,2-7; 7-10). Observamos, a partir desta análise, diferenças na complexidade e no conteúdo total de proteínas das 5 diferentes frações obtidas, tanto para a amostra de filtrado de cultura como para a de proteínas associadas à superfície de BCG Moreau (figura 4.4).

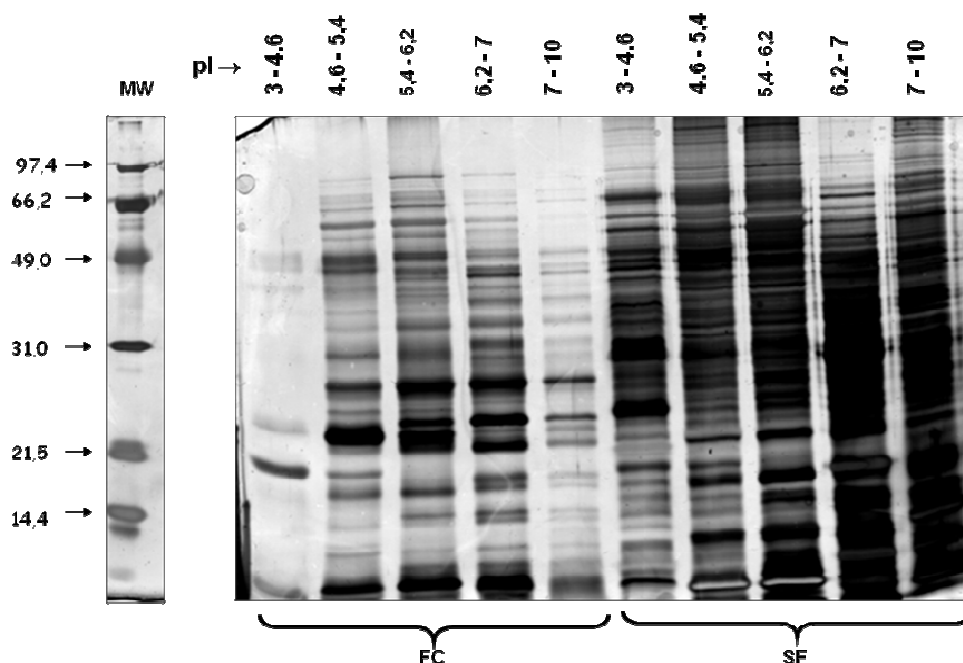


Figura 4.4: SDS PAGE 12% das frações obtidas a partir do fracionamento das amostras protéicas de *M. bovis* BCG Moreau (filtrado de cultura e superfície, conforme indicado) utilizando o Zoom<sup>®</sup> IEF Fractionator (Invitrogen). Foram aplicados 5 µg de cada uma das 5 frações resultantes (pHs 3 – 4,2; 4,2 – 5,4. 5,4 – 6,2; 6,2 – 7 – 10). A coloração do gel foi feita por impregnação por prata e o marcador de peso molecular (MW) está indicado à esquerda, em kDa.

Cabe ressaltar que embora as proteínas contidas nas frações pH 7-10, de ambos extratos protéicos de *M. bovis* BCG Moreau (FC e SF), não tenham sido utilizadas neste trabalho, estas estão estocadas podendo ser recuperadas, a fim de ampliar a análise de sororeatividade, visto a presença de elevado conteúdo protéico nesta faixa de pH.

#### 4.1.5 Comparação do padrão 2DE das amostras protéicas do filtrado de cultura e de superfície de *M. bovis* BCG Moreau fracionadas ou não com Zoom<sup>®</sup> IEF Fractionator

Para compararmos os padrões 2DE das amostras protéicas (FC e SF) não fracionadas (figura 4.5, painéis B e D) e fracionadas (figura 4.5, painéis A e C) com Zoom<sup>®</sup> IEF Fractionator utilizamos tiras IPG de 7 cm pH 4 – 7 para focalização isoeletrica e géis SDS-PAGE 12% ou 15% (figura 4.5).

O resultados obtidos revelaram que em ambas as amostras fracionadas (FC e SF) houve um aumento expressivo na concentração de proteínas com pontos isoeletricos dentro da faixa de pH de interesse. Além disso, observamos uma redução substancial dos *streaks* próximos à extremidade básica dos géis (figura 4.5 – B e D).

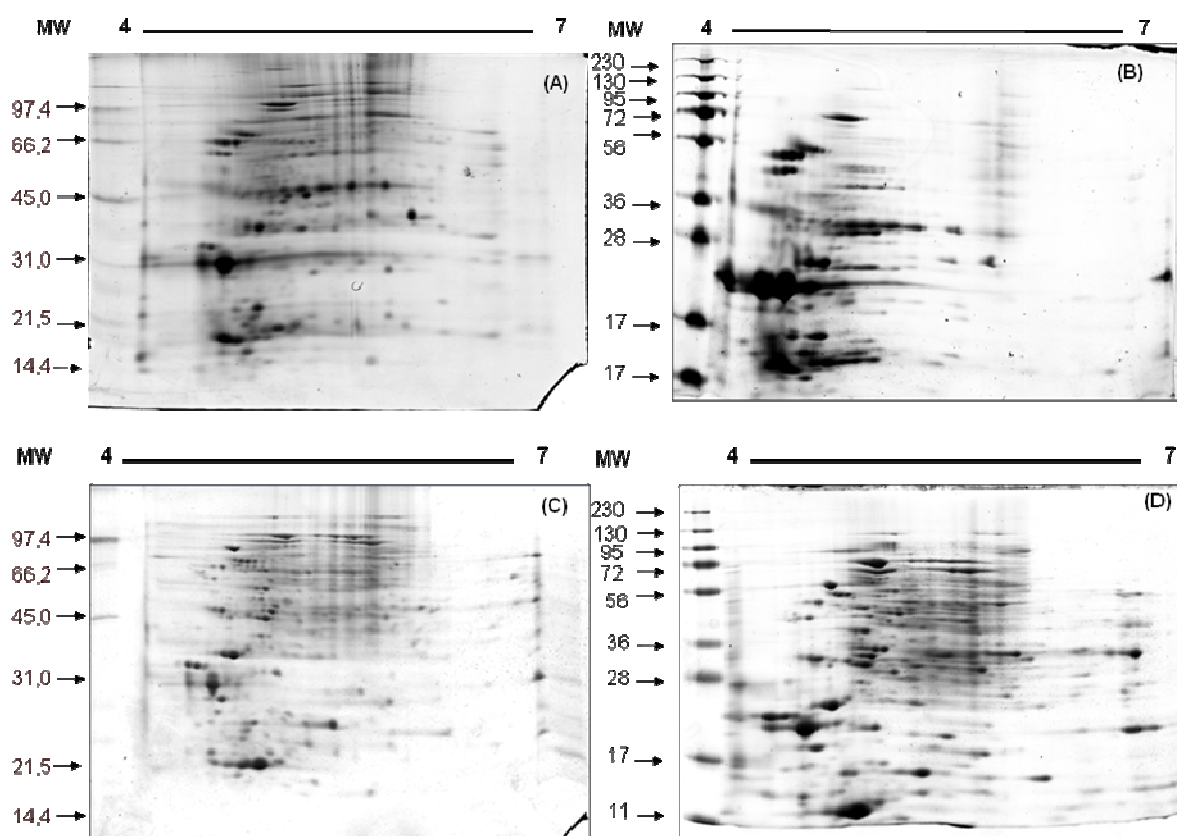


Figura 4.5: Géis 2DE com 100ug de proteínas não fracionadas das frações de FC (A) e SF (C) utilizando fitas de 7cm, pH 4-7 para focalização isoeletrica. Os painéis B e D correspondem às mesmas quantidades de proteínas das frações FC e SF, respectivamente, com valores de pI entre 4 e 7 após pré-fracionamento com Zoom® IEF fracionador (Invitrogen) Separação na primeira dimensão em tiras IPG de 7cm, pH 4-7, e na segunda dimensão em géis SDS-PAGE 12% (B) e (D) e 15% (A) e (C). Todos os géis foram corados com CBB-G250. Os marcadores de peso molecular (MW) estão indicados na figura, em kDa.

#### 4.1.6 Efeito da focalização isoeletrica preparativa e da purificação de IgG nos ensaios de 2DE-WB.

Neste estudo observamos que a focalização isoeletrica preparativa e a purificação das IgGs a partir dos *pools* de soros dos indivíduos envolvidos no estudo se revelaram úteis para a redução acentuada do *background* nos testes de 2DE-WB (figura 4.6). Em (A) observamos um maior *background* em virtude da ausência da focalização isoeletrica preparativa e da IgG-purificação.

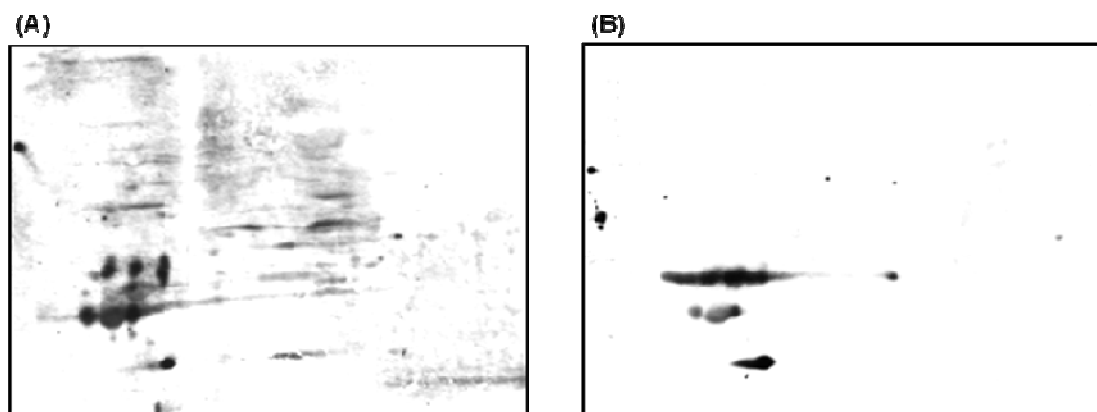


Figura 4.6: 2DE-WB da fração de proteínas de superfície de BCG Moreau não fracionadas (A) e fracionadas (B), frente ao *pool* de soros dos indivíduos IFN $\gamma$  alto não purificado (A) e IgG-purificados (B). Em todas as condições o bloqueio foi de 5% de BSA por 2 horas à temperatura ambiente. *Pool* de soros nas diluições de 1:500 (A) e 1:5000 (B), e anticorpo secundário conjugado a peroxidase 1:100.000.

#### 4.2 Perfil Imunoproteômico das Proteínas Extracelulares de *M. bovis* BCG Moreau - Aspectos Gerais

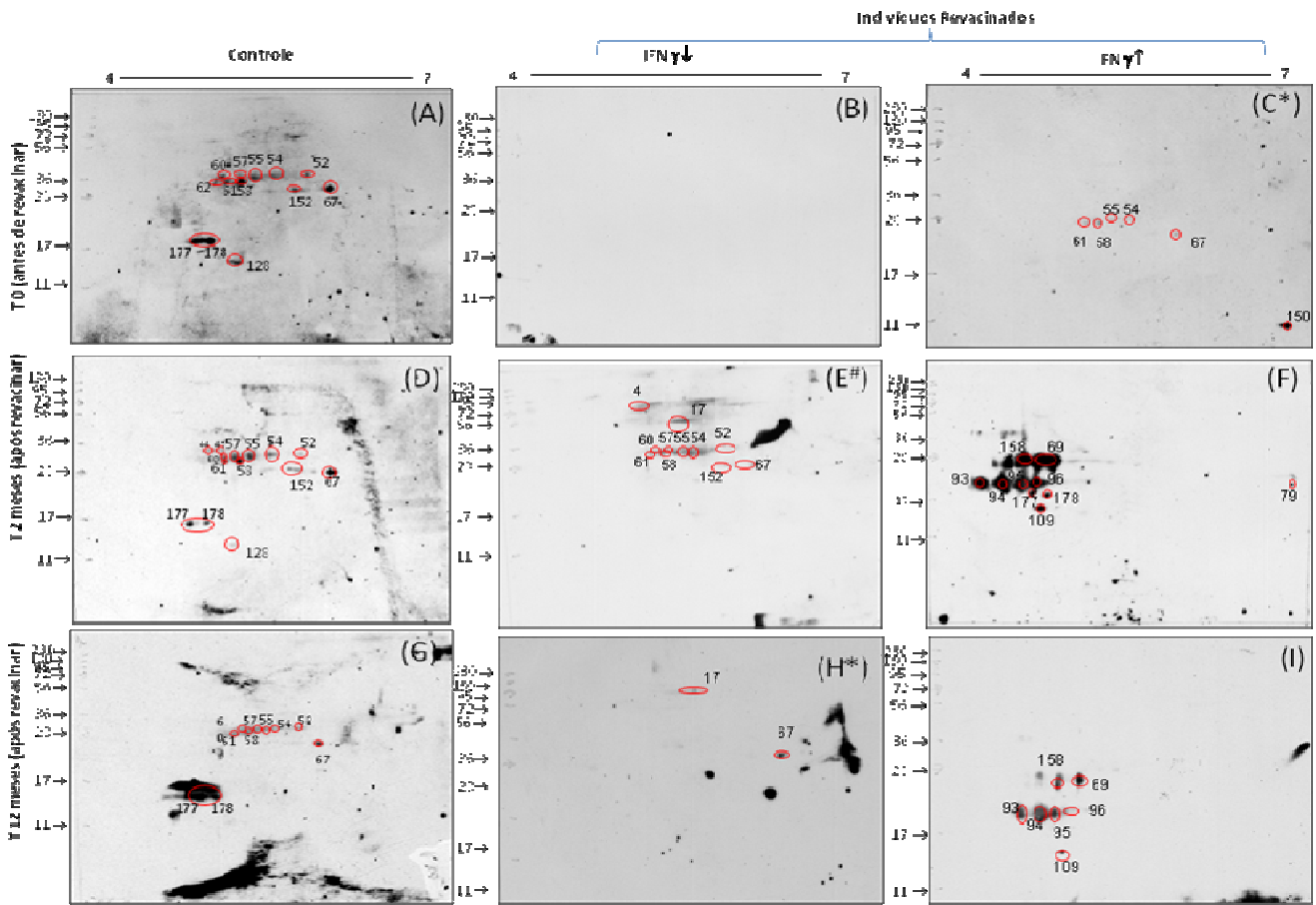
A análise dos perfis imunoproteômicos dos diferentes grupos estudados foi realizada através da comparação do padrão de reconhecimento humoral de antígenos secretados de BCG Moreau em western blots bi-dimensionais (2DE-WB). Para isto, proteínas totais das frações de filtrado de cultura (FC) e superfície (SF) de BCG Moreau, cultivado nas condições de produção da vacina intradérmica (meio Sauton), foram resolvidas em géis 2DE, transferidas para membranas de nitrocelulose e reagidas contra o *pool* de soros dos diferentes grupos incluídos neste estudo, nas condições ótimas padronizadas acima, gerando painéis de 9 WBs-2DE (figuras 4.7 e 4.8, FC e SF, respectivamente), em função do tempo após a revacinação .

As figuras 4.7 e 4.8 mostram, respectivamente, o perfil de reconhecimento protéico do FC e da SF pelos *pools* de soros dos indivíduos envolvidos no estudo: controle (painéis A, D e G), indivíduos revacinados com baixos níveis de IFN $\gamma$  (painéis B, E e H) e alto produtores desta citocina (painéis C, F e I). A análise comparativa revelou que em ambas as frações estudadas (FC e SF), os indivíduos com altos níveis de IFN $\gamma$  reconheceram principalmente proteínas com peso molecular entre 28-11kDa e ponto isoelétrico (pI) entre 4.0-5.0. Já os indivíduos baixo produtores de IFN $\gamma$  reconheceram proteínas com peso molecular acima de

28kDa, com variação de *pI* entre 5.0-6.0. Este padrão imunoproteômico foi observado 2 meses após a revacinação e mantido até 12 meses.

A tabela 4.1 reporta o número de *spots* reconhecidos pelo *pool* de soros dos indivíduos estudados, nos diferentes tempos analisados. Os *spots* imunoreativos de interesse foram identificados nos géis de referência de proteínas totais do FC e de SF pela sobreposição das imagens (filme, membrana corada e gel corado com CBB). Os *spots* diferenciais de interesse foram excisados dos géis de referência e identificados por espectrometria de massas. Em algumas das condições avaliadas, a fim de aumentar a sensibilidade de detecção de alguns *spots*, o tempo de exposição dos filmes foi ampliado até 15 minutos. Os *spots* imunoreativos estão marcados nos géis de referência (Figura 4.9) e listados nas tabelas 4.2 e 4.3.

Ao compararmos o padrão imunoproteômico, observado no filme radiográfico, com os respectivos géis de referência das frações do FC e de SF corados com CBB (Figura 4.9, painéis A e B, respectivamente), observamos que o número de *spots* imunoreativos foi substancialmente inferior ao número total de *spots* observados nos géis, correspondendo a aproximadamente 7% das proteínas do FC e 9% das de SF. Este maior percentual na fração SF reflete ao maior número de *spots* observado nesta.





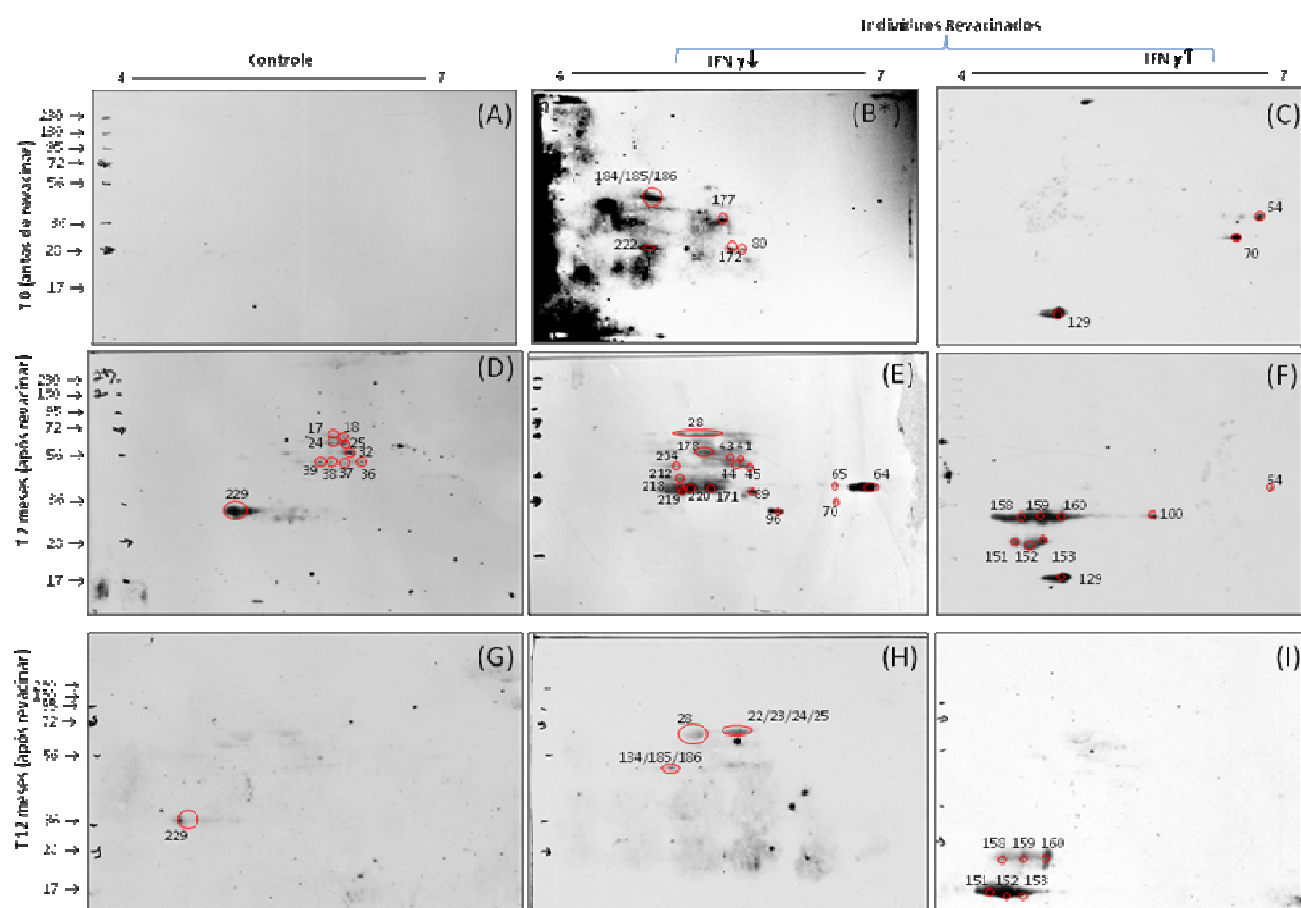


Figura 4.8 Perfis imunoproteômicos representativos da fração de proteínas de superfície (SF) de *M. bovis* BCG Moreau. (A, D, G) controles (não revacinados); (B, E, H) indivíduos  $\text{IFN}\gamma\downarrow$ ; (C, F, I) indivíduos  $\text{IFN}\gamma\uparrow$  nos tempos 0 (A-C), 2 meses (D-F) e 12 meses (G-I) após revacinação. Foram utilizadas IgGs purificadas de cada pool de soros, na diluição 1: 5000. As proteínas imunoreativas identificadas estão indicadas na figura. O marcador de peso molecular está indicado à esquerda, em kDa. O tempo de exposição foi de 1 min, exceto quando indicado (\* 5min e # 15min de exposição).

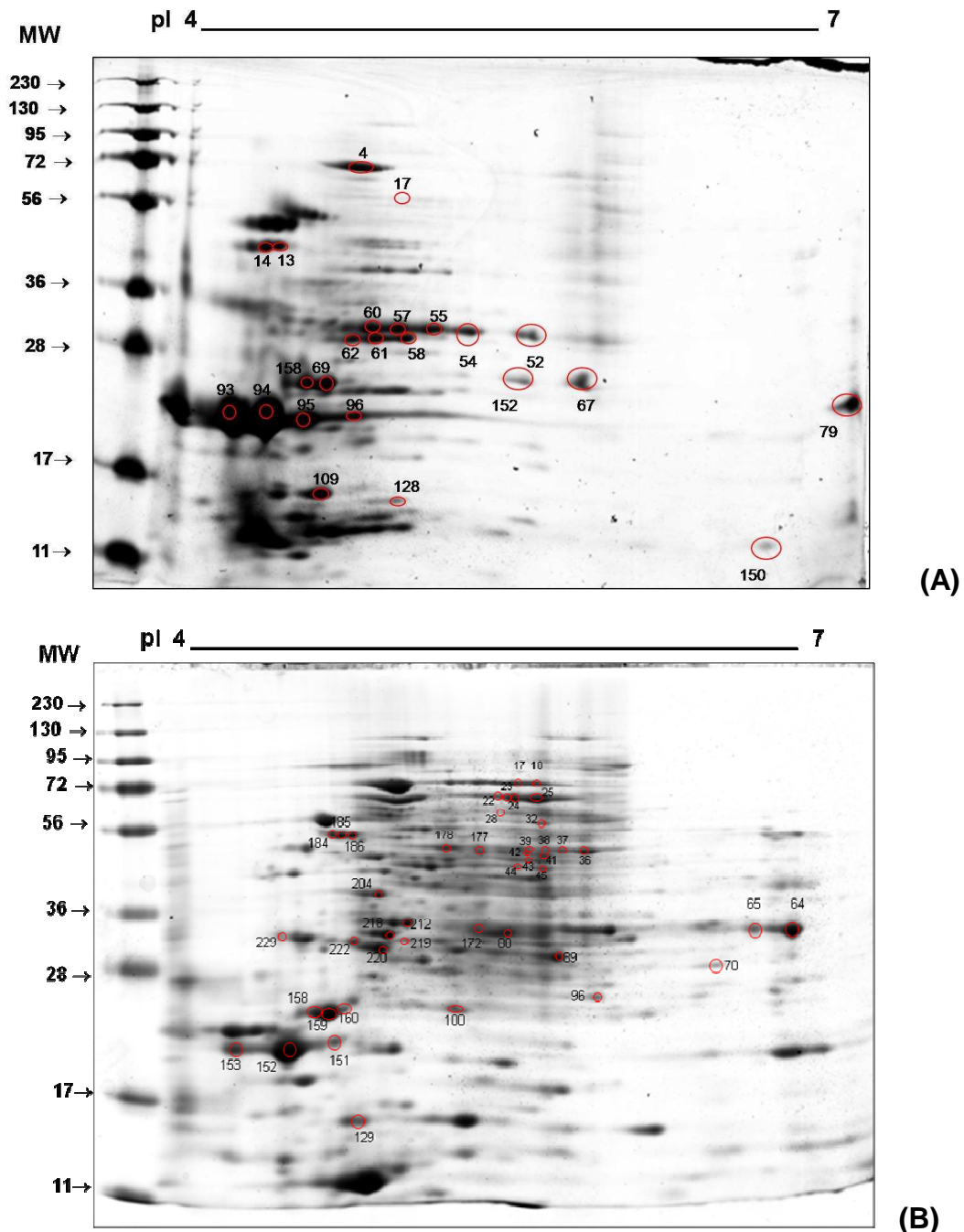


Figura 4.9: Perfil proteômico bidimensional das proteínas do filtrado de cultura (A) e de superfície (B) de *M. bovis* BCG Moreau cultivado no meio de produção da vacina intradérmica (meior Sauton). As estratégias para obtenção destas frações proteicas estão descritas em materiais e métodos. Aliquotas de 100  $\mu$ g de cada amostra foram submetidas à focalização isoeletrica, utilizando tiras IPG de 7 cm na faixa de pH 4-7. A segunda dimensão foi feita em géis SDS-PAGE 15% (filtrado de cultura) ou 12% (superfície) e as proteínas visualizadas pela coloração com coomassie coloidal. Os spots numerados correspondem às proteínas identificadas nas figuras 4.7 e 4.8 e listadas nas tabelas 4.2 e 4.3.

#### 4.3 O Imunoproteoma Diferencial - Filtrado de Cultura e Fração de Superfície

Comparamos os padrões de reconhecimento humoral dos diferentes grupos de indivíduos, 2 e 12 meses após a revacinação, a fim de identificar possíveis diferenças que pudessem vir a fornecer alvos em potencial (biomarcadores) para

uma correlação com a resposta protetora da vacina BCG. A Figura 4.10 representa, esquematicamente, a forma como foram feitas as análises comparativas. Consideramos como de maior relevância os *spots* reconhecidos exclusivamente pelos indivíduos classificados como alto produtores de IFN $\gamma$  no tempo de 2 meses, que permaneceram positivos 1 ano após a revacinação.

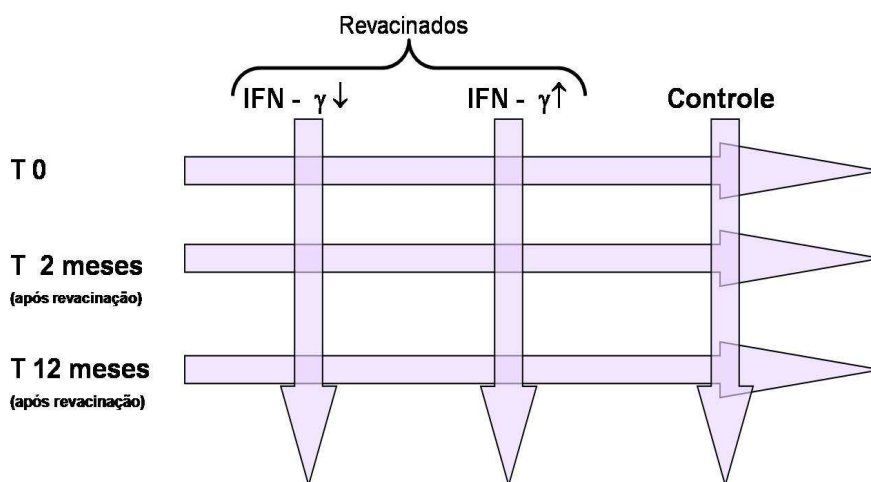
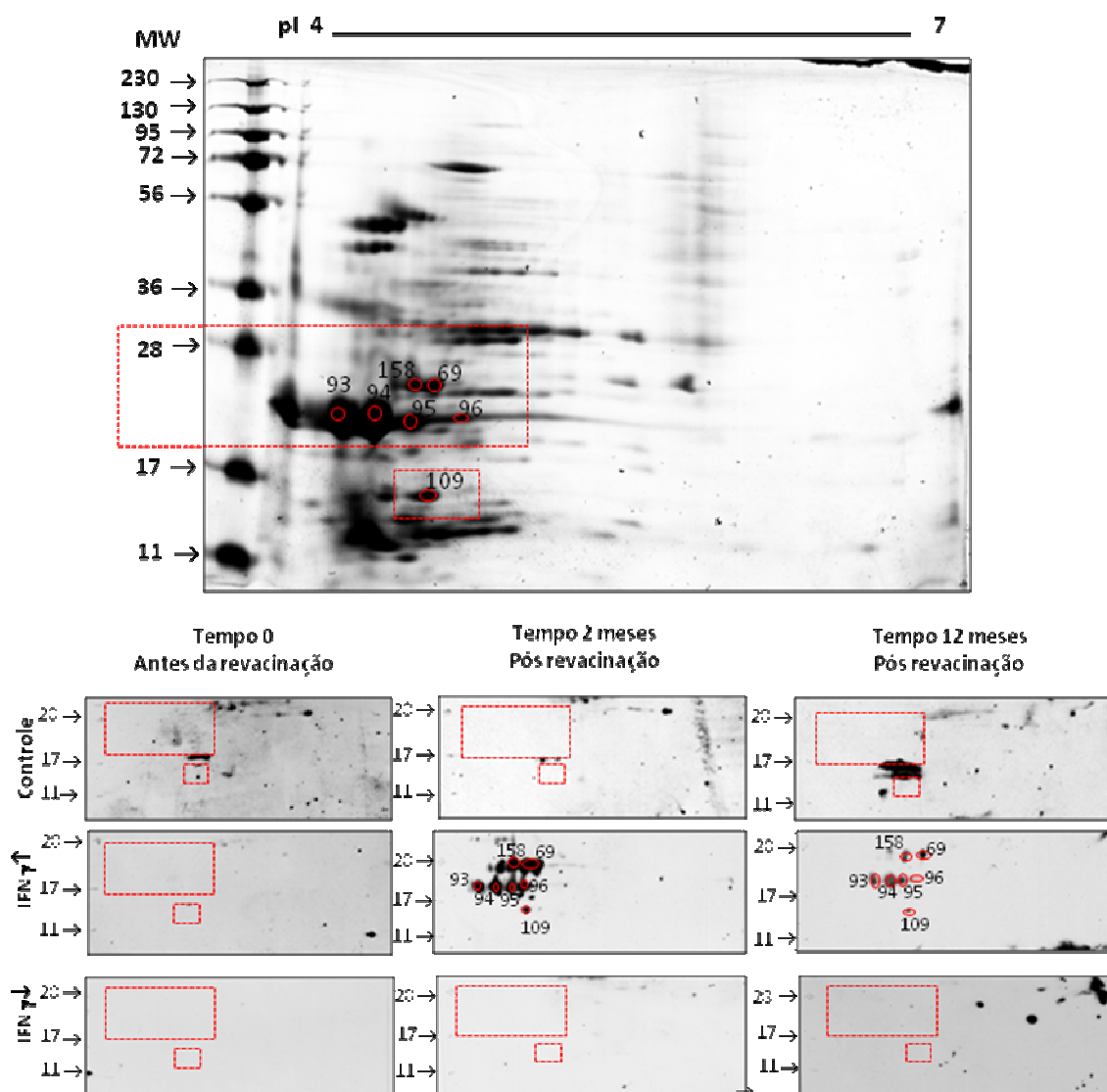


Figura 4.10: Esquema representativo das condições e tempos analisados para a análise comparativa.

Os resultados obtidos mostram antígenos diferencialmente reconhecidos (tabelas 4.4 e 4.5). No entanto, é importante ressaltar que somente para a fração do FC em todas as condições analisadas, e pelo menos em um dos tempos avaliados, foi observado um conjunto de proteínas comumente imunorreativas frente a todos os soros dos indivíduos estudados. Estas proteínas fazem parte do complexo 85, que engloba os antígenos 85A (Rv3804c; *spots* 52, 54, 55 e 57), 85B (Rv1886c; *spot* 58) e 85C (Rv0129c; *spots* 61 e 62) e a proteína Mpt51 (Rv3803c; *spots* 67 e 152) (figura 4.7). Todavia, ao aumentarmos o tempo de exposição do filme radiográfico para até 15 minutos fomos capazes de observar o reconhecimento destes antígenos em todos os grupos e tempos analisados (dados não mostrados).

Com relação ao imunoproteoma do FC, os antígenos Mpt63 (Rv1926c; *spot* 109), Mpt64 (Rv1980c; *spots* 69 e 158) Mpt70 (Rv2875; *spots* 93, 94 e 95), Mpt83 (Rv2873; *spot* 94) e Cfp21(Rv1984c; *spot* 96) foram reconhecidos apenas pelos indivíduos com elevados níveis de IFN $\gamma$ . Este reconhecimento foi observado 2 meses após a revacinação, acompanhando o pico máximo da resposta de IFN $\gamma$ , e mantido até 12 meses (figura 4.11). No imunoproteoma de SF apenas as proteínas Mpt64 (*spots* 158, 159 e 160) e Mpt70 (*spots* 151, 152 e 153) foram reconhecidas pelos soros do mesmo grupo de indivíduos, nos mesmos tempos (figura 4.12). A

proteína Mpt63 (*spot* 129) não se destacou como diferencial nesta fração protéica, entre os grupos revacinados, uma vez que os indivíduos com altos níveis de IFN $\gamma$  a reconheceram, inclusive no tempo zero, antes da revacinação.



Número do <i>Spot</i>	ORF correspondente no genoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	gene	Identificação da Proteína
69/158	<i>rv1980c</i>	<i>mpt64</i>	Proteína imunogênica Mpt64
93/95	<i>rv2875</i>	<i>mpt70</i>	Proteína imunogênica Mpt70
94	<i>rv2875/rv2873</i>	<i>mpt70/mpt83</i>	Proteína imunogênica Mpt70/Mpt83
96	<i>rv1984c</i>	<i>cfp21</i>	Provável precursor da cutinase
109	<i>rv1926c</i>	<i>mpt63</i>	Proteína imunogênica Mpt63

Figura 4.11: Imunoproteoma das proteínas do Filtrado de cultura de *M. bovis* BCG Moreau. Gel de referência corado com coomassie coloidal. Os *spots* diferencialmente reconhecidos, assinalados, foram identificados por espectrometria de massas e estão listados na tabela. As regiões aumentadas correspondem aos WB-2DE dos grupos estudados nos diferentes tempos analisados conforme indicado. Marcador de peso molecular em kDa indicado à esquerda

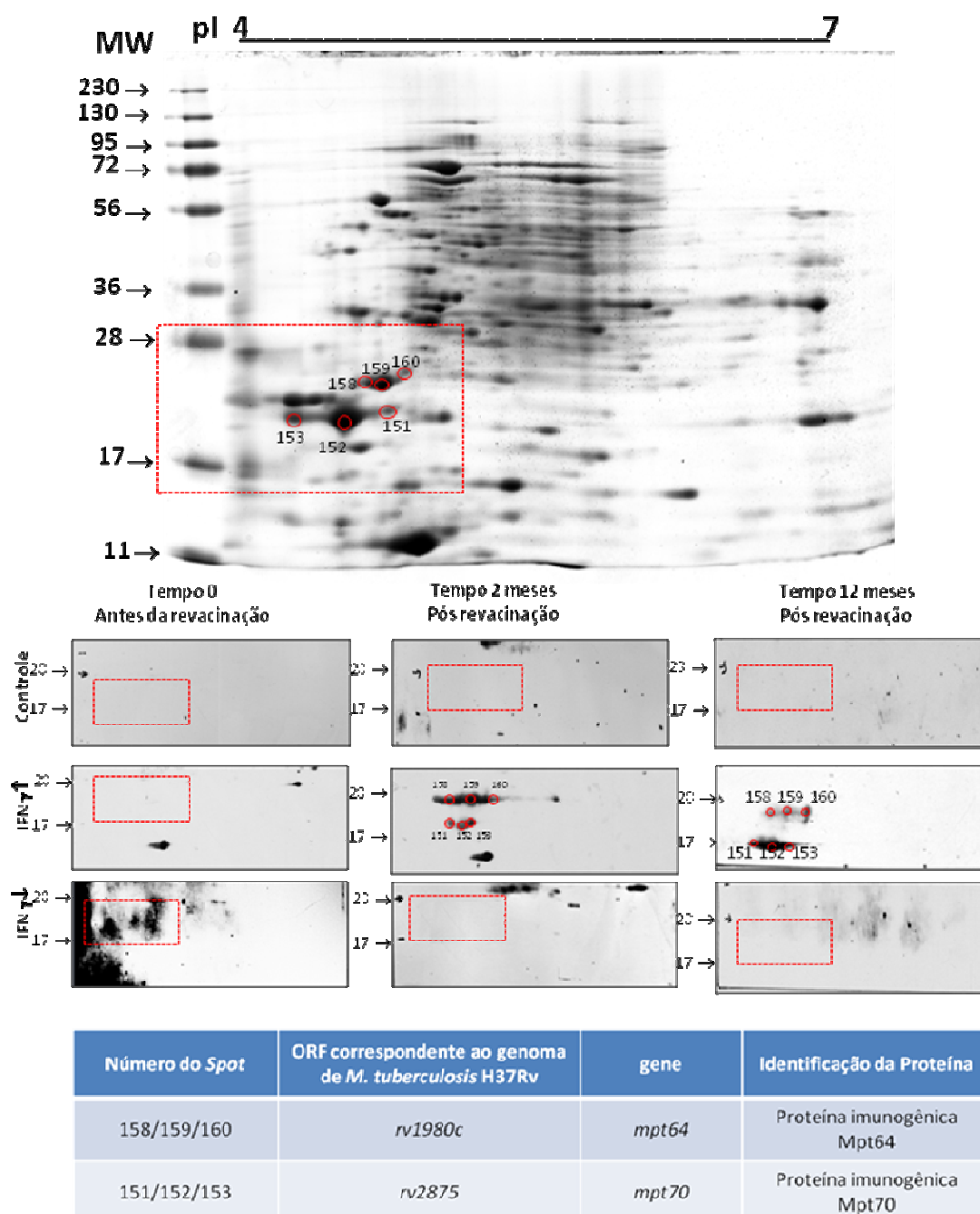


Figura 4.12: Imunoproteoma das proteínas de superfície de *M. bovis* BCG Moreau. Gel de referência corado com coomassie coloidal. Os spots diferencialmente reconhecidos, assinalados, foram identificados por espectrometria de massas e estão listados na tabela. As regiões aumentadas correspondem aos WB-2DE dos grupos estudados nos diferentes tempos analisados conforme indicado. Marcador de peso molecular em kDa indicado à esquerda

A proteína glutamina sintetase, (Rv2220; spots 17 [FC] e 28 [SF]) foi reconhecida em ambas as frações de estudo apenas pelos indivíduos classificados como baixo produtores de IFN $\gamma$ , tanto 2 meses quanto 12 meses após a revacinação (figura 4.13).

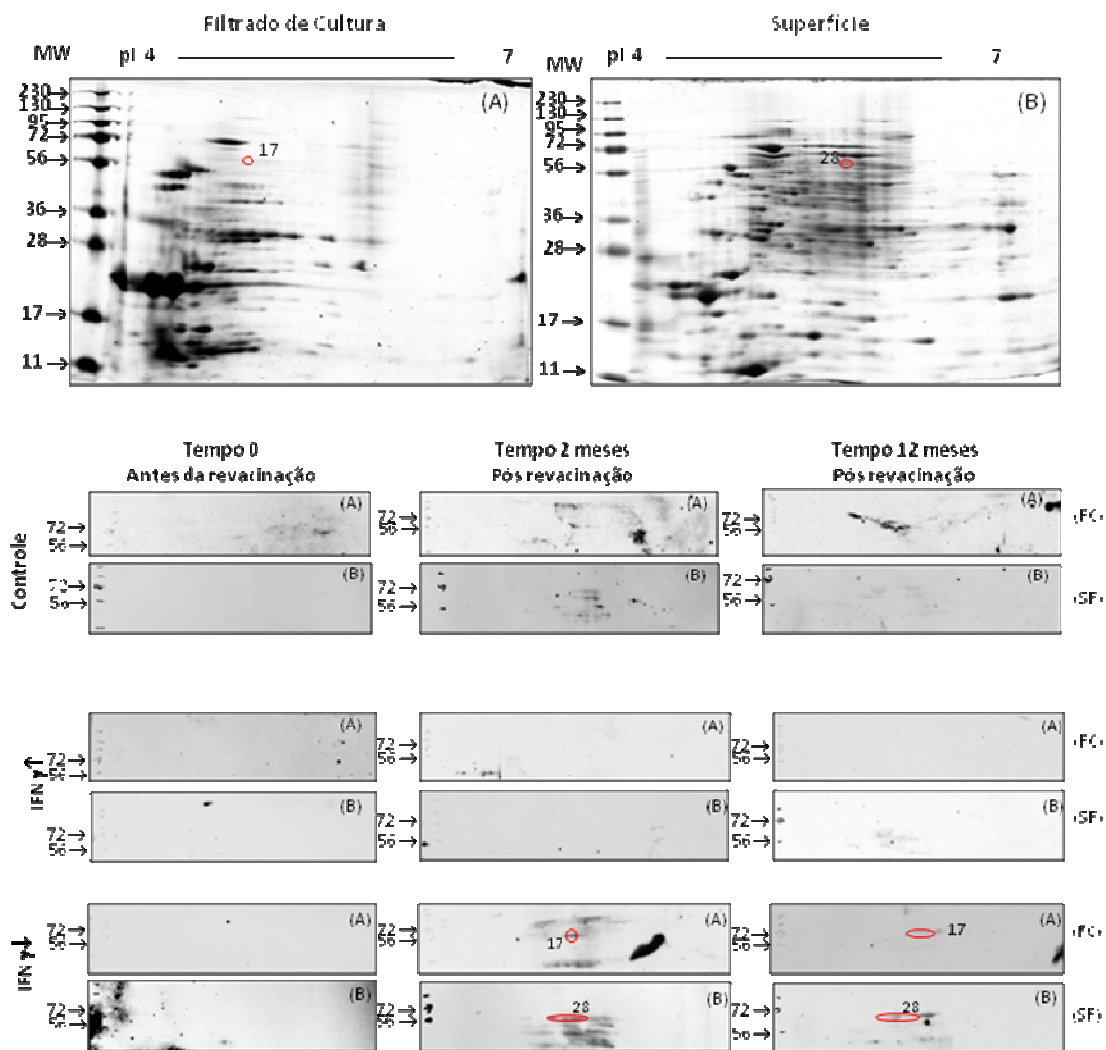


Figura 4.13: Imunoproteoma do filtrado de cultura (A) e de superfície (B) de *M. bovis BCG Moreau*. Géis de referência do filtrado de cultura (A) e de superfície (B) corados com coomassie coloidal. Os spots diferencialmente reconhecidos, assinalados, foram identificados por espectrometria de massas e correspondem a GlnA1, reconhecida apenas pelos indivíduos baixo produtores de IFN $\gamma$ , nos tempos 2 e 12 meses após revacinação. As regiões aumentadas correspondem aos *Western-blot* dos grupos estudados nos diferentes tempos analisados conforme indicado. Marcador de peso molecular indicado à esquerda, em kDa.

A proteína rica em prolina e alanina, Apa (Rv1860; spots 13 e 14) foi também diferencialmente reconhecida na fração do FC pelo soro dos indivíduos com alto nível de IFN $\gamma$ . No entanto, este reconhecimento só foi melhor observado 12 meses após a revacinação com um tempo de exposição do filme radiográfico de 15 minutos (Figura 4.14).

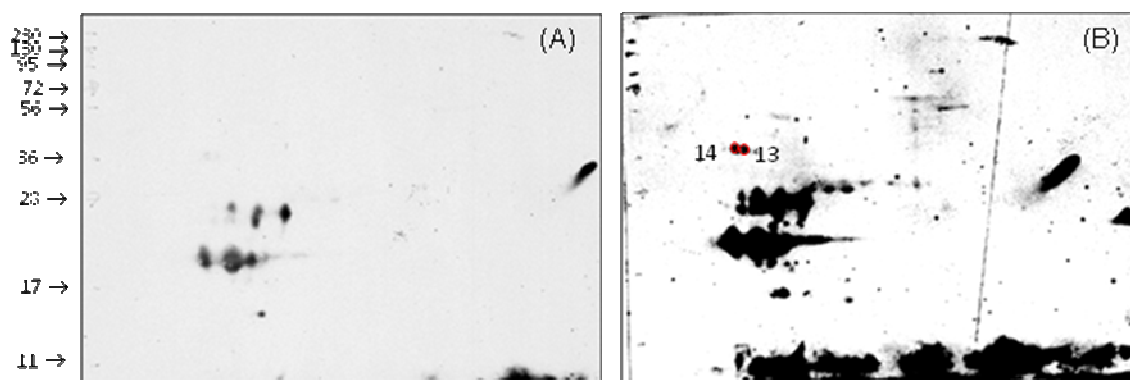


Figura 4.14: Perfil imunoproteômico do filtrado de cultura de *M. bovis* BCG Moreau contra o *pool* de soros (1:5000) dos indivíduos com elevado nível de INF- $\gamma$  12 meses após a revacinação. (A) 1' e (B) 15' de exposição do filme radiográfico, onde foi possível observar o reconhecimento da proteína Rv1860.

Uma proteína reconhecida apenas na fração de SF pelos soros de indivíduos com alto nível de IFN $\gamma$  2 meses após a revacinação, foi a proteína hipotética RV1732c (*spot* 100) (figura 4.9)

A maioria das proteínas antigênicas identificadas como diferenciais neste trabalho, Mpt63 (Rv1926c), Mpt70 (Rv2875), Mpt83 (Rv2873), Mpt64 (RV1980) e a proteína Apa (Rv1860) possuem peptídeo sinal canônico conforme predição do algoritmo SignalP 3.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)). Além disto, segundo o banco de dados Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>) elas são funcionalmente classificadas como proteínas envolvidas em processos celulares e parede celular. Uma exceção é a proteína GlnA1 (RV2220), única proteína reconhecida exclusivamente pelos indivíduos com baixa produção de IFN $\gamma$ . Esta proteína é uma enzima que possui expressão constitutiva e está envolvida no metabolismo intermediário e respiração celular. Apesar de sua localização citoplasmática, há relatos na literatura de sua presença no ambiente extracelular (Tullius, Harth e. Horwitz, 2001).

Assim, as proteínas Apa, GlnA1, Mpt64, Mpt70 e Mpt83, identificadas como diferenciais através dos estudos apresentados acima, cujo reconhecimento humoral mostrou correlação com o perfil de resposta de produção de IFN $\gamma$ , foram selecionadas e expressas sob forma recombinante em *Escherichia coli*, para avaliarmos mais detalhadamente o padrão de reconhecimento humoral, frente aos soros individualizados, e futuramente verificarmos a aplicabilidade das mesmas como prováveis correlatos de proteção oferecida pela vacinação com BCG Moreau. A proteína Apa, sob a forma recombinante, gentilmente cedida pela Dra Cynthia Horn IPEC-Fiocruz, foi clonada e expressa de modo similar ao empregado para as

demais proteínas incluídas neste estudo, também possuindo cauda de histidina para a purificação.



Tabela 4.1 Número de antígenos reconhecidos pelo *pool* de soros dos indivíduos analisados nos diferentes tempos de estudo frente às amostras proteicas estudadas

Grupos	T0		T2		T12	
	Superfície	Filtrado de cultura	Superfície	Filtrado de cultura	Superfície	Filtrado de cultura
Controle	∅	6	4	8	1	3
IFN $\gamma$ $\uparrow$	2	3*	5	7	2	4
IFN $\gamma$ $\downarrow$	5*	∅	7	6 <sup>#</sup>	3	1

∅ - Spots protéicos não imunoreativos

\* 5 minutos de tempo de exposição do filme radiográfico

<sup>#</sup> 15 minutos de tempo de exposição do filme radiográfico

Tabela 4.2 - Identificação das proteínas do filtrado de cultura de *M. bovis* BCG Moreau imunologicamente reconhecidas pelos pools de soros dos indivíduos classificados como alto e baixo produtores de INFγ

no. Spot	Rv	BCG	gene	Identificação da proteína	Score	Peptídeos identificados	Ion score	Cob. (%)	pl Teórico	pl Exp.	MM Teórico	MM Exp.
4	Rv0350	BCG0389	<i>dnaK</i>	PROBABLE CHAPERONE PROTEIN DNAK (HSP70)	202	H(b)TIGQAEQAAMSAQAFHQGESSAAFQAA	31	8	4,59	4,77	66830	66280
						HAR DAGQIAGLNVLR	52					
						LLGSFELTGIPPAPR	48					
						SETFTTADDNQPSVQIQVYQGER	106					
150	Rv0287	BCG0327	<i>esxG</i>	ESAT-6 LIKE PROTEIN - ESXG	138	H(b)TIGQAEQAAMSAQAFHQGESSAAFQAAH AR	109	52	6	7,04	9,77	11,97
						TADGINYR GSVTPAVSQFNAR	40					
109	Rv1926c	BCG1965c	<i>mpt63</i>	IMMUNOGENIC PROTEIN MPT63	431	LGSELTM <sup>(a)</sup> TDTVGQVVLGWK	93	57	4,67	4,47	16,51	15,61
						VLWQAAAGPDTISGATIPQGEQSTGK	62					
						SSTAVIPGYPVAGQVWEATATVNAIR	104					
69, 158	Rv1980c		<i>mpt64</i>	IMMUNOGENIC PROTEIN MPT64 (ANTIGEN MPT64/MPB64)	230	AFDWDQAYR	56	20	4,6	4,50	24,82	21
						SLENYIAQTR	42					
						DKFLSAATSSTPR	61					
						VYQNAAGTHPTTTYK	71					
96	Rv1984c		<i>clp21</i>	PROBABLE CUTINASE PRECURSOR CFP21	172	RGTHQASGLGDVGEAFVDSLTSQVGG	97	19	5,88	4,55	21,78	16,6
						ASASNGSDDASAHQR	72					
						SVFDDGLAFDGSIR	89					
17	Rv2220	BCG2237	<i>glnA1</i>	GLUTAMINE SYNTHETASE GLNA1	251	GGYFPVAPNDQVVDLR	89	10	5,04	5,44	53,53	59,34
						DGAPLMYDETYAGLSDTAR	65					
79	Rv2429	BCG2448	<i>ahpD</i>	ALKYL HYDROPEROXIDE REDUCTASE D	154	N <sup>(b)</sup> PQVLADIGAEATDHLASAAAR	90	23	7,06	7,04	18,78	23,64
						SSVLDQEQQLWGTLLASAAATR	68					
128	Rv2626c	BCG2653c	<i>Rv2626c</i>	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN	39	GLAAGLDPNTATAGELAR	41	12	4,77	4,56	15,51	15,33
						IDGTHQTLQGGADLTIVIGAR	140					
94	Rv2873	BCG2895	<i>mpt83</i>	CELL SURFACE LIPOPROTEIN MPT83 (LIPOPROTEIN P23)	153	LLSSILTYHVIAGQASPSR	17	17	4,73	4,2	22,07	21,8
						LPASTIDELK	61					
93, 94,95	Rv2875	BCG2897	<i>mpt70</i>	MAJOR SECRETED IMMUNOGENIC PROTEIN MPT70	356	QTLQGASVTVTGGQNSLK	154	28	4,54	4,20	19,07	21,8
						TNSSLLTSILTYHYVAGQTS PANVVGTR	145					
						K.Q <sup>(d)</sup> V PDTW <sup>(b)</sup> SER	29					
62	Rv3029c	BCG3052c	<i>fixA</i>	PROBABLE ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN FIXA	22	VTDEGEGGNQVQYLVAQK	30	22	4,37	4,59	28,08	26,3
						ETDEGVFTLEATLPAVISVNEK	53					
67	Rv3803c	BCG3865c	<i>fbpD</i>	MPT51 ANTIGEN PROTEIN FBPD (AG58C)	84	M <sup>(a)</sup> FYNQYR	29	13	6,63	5,22	31,08	25,65
						Q <sup>(c)</sup> WDTFLSAELPDWLAANR	61					
						APYENLM <sup>(a)</sup> VPSPSMGR	36					
						WETFLTSELPGWLQANR	58					
52,54,55,57	Rv3804c	BCG3866c	<i>fbpA</i>	SECRETED ANTIGEN 85-A (FBPA)	314	VQFQSGGANSPALYLLDGLR	141	25	6,51	5,6	35,68	30,9
						ALGATPNTGPAPQGA	64					
						ASDM <sup>(a)</sup> WGPKEPAWQR	31					
						VWVYC <sup>(b)</sup> GN <sup>(d)</sup> GKPSDLGGNNLPAK	30					
58	Rv1886c	BCG1923c	<i>fbpB</i>	SECRETED ANTIGEN 85-B FBPB	257	ASDMWGPSSDPAWQ <sup>(c)</sup> R	47	20	5,72	5,27	34,58	29,57
						AADM <sup>(a)</sup> WGPSSDPAWER	63					
						WETLLTSELPGWLSANR	51					
						VQ <sup>(c)</sup> FQSGGNNSPA VYLLDGLRc	148					
44 45	Rv2971	BCG2993		PROBABLE OXIDOREDUCTASE	258	LATPDQGFTR	27	24	4,7	4,77	30,34	31,83
						WNLQLGNVAVVVR	27					
						YVDAWGGMIQSR LIDTAYAYGNEAAVGR	60					
						ANAQHTVVVTQSYCPLALGR	111					
177												
178												

<sup>(a)</sup> Metionina modificada por oxidação

<sup>(b)</sup> Tryptofano modificado por oxidação

<sup>(c)</sup> Peptídeos com asparagina ou glutamina modificada por deamidação

<sup>(d)</sup> Peptídeos com modificação da glutamina para ácido piroglutâmico na porção N-terminal.

<sup>(e)</sup> Cisteína modificada por carbamidometilação

Obs<sub>1</sub>: Todas as proteínas identificadas pertencem ao gênero *Mycobacterium*

Obs<sub>2</sub>: O número Rv indica o gene no genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Obs<sub>3</sub>: O número BCG indica o gene no genoma de *Mycobacterium bovis* AF2122/97

Tabela 4.3 - Identificação das proteínas associadas à superfície de *M. bovis* BCG Moreau imunologicamente reconhecidas pelos pools de soros dos indivíduos classificados como alto e baixo produtores de INF $\gamma$ 

no. Spot	Rv	BCG	gene	Identificação da proteína	Score	Peptídeos identificados	Ion score	Cob. (%)	pI Teórico	pI Exp.	MM (Da)	MM Teórico (Da)	MM Exp.
17 18	Rv0350	BCG0389	<i>dnaK</i>	PROBABLE CHAPERONE PROTEIN DNAK (HSP70)	151	ATSGDNHLGGDDWDQR YTAPEISAR	75 25	4	4.59	4.85	66830	66790	
229	Rv0351	BCG0390	<i>grpT</i>	PROBABLE GRPE PROTEIN (HSP-70 COFACTOR)	84	VQADFANYR QGYQLGEQ <sup>(d)</sup> VLR	35 52	8	4.17	4.46	24500	24540	
22 23 24 25	Rv0440	BCG0479	<i>groEL-2</i>	CHAPERONIN GROEL2 (HSP60)	176	DETTIVEGAGDTPDAIAGR QEIENSDSDYDREK	105 70	10	4.56	4.85	56726	56692	
36 37 38 39 177	Rv0685	BCG0734	<i>tuf</i>	PROBABLE IRON-REGULATED ELONGATION FACTOR TU (EF-TU)	333	LIQPVAM <sup>(b)</sup> DEGLR AFDQIDNAPEER ELLAAQEFDEEDAPVVR LLDQGGQAGDNVGLLLR GQVVTKPGTTTPHTEFEGQVYLSK	26 69 93 122 56	3	5.12	5.28	43561	43566	
70	Rv1484	BCG1546	<i>inhA</i>	NADH-DEPENDENT ENOYL-ACP REDUCTASE	80	VAQEQAQLVLTGFDR	80	5	6.02	5.73	28527	28498	
100	Rv1732c	BCG1771c	<i>rv1732c</i>	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN	157	AFSAACTPDTFVFDGQR GQLDDSRPGNGRPVTAADVR	127 36	20	4.87	5.02	19398	19387	
129	Rv1926c	BCG1965c	<i>mpt63</i>	IMMUNOGENIC PROTEIN MPT63	320	GSVTPAVSQFNAR VLWQAAAGPDTISGATIPQGEQSTGK SSTAVIPGYPVAGQVWEATATVNAIR	85 104 134	40	4.67	4.6	16513	16504	
158, 159, 160	Rv1980c		<i>mpt64</i>	IMMUNOGENIC PROTEIN MPT64	133	AFDWDQAYR VYQNAAGGTHPTTTYK	56 78	13	4.60	4.84	24823	25068	
212	Rv2145c	BCG2162c	<i>wag31</i>	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN WAG31	230	TYLESQLEELGQR GSAAPVDSNADAGGFDFQFNR	58 171	12	4.52	4.80	28277	28260	
28	Rv2220	BCG2237	<i>glnA1</i>	GLUTAMINE SYNTHETASE GLNA1	178	SVFDDGLAFDGGSSIR GGYFPVAPNDQYVDLR	89 89	6	5.0	5.4	53439	55400	
151, 152, 153	Rv2875	BCG2897	<i>mpb70</i>	MAJOR SECRETED IMMUNOGENIC PROTEIN MPT70	210	QTLQGSVTVTGQGN <sup>(d)</sup> SLK LPASTIDELK	136 57	14	4.54	4,51 4,47	19072	16355 16357 16357	
218, 219	Rv3028c	BCG3051c	<i>fixB</i>	PROBABLE ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN FIXB	381	IGSGLLVDDVDVR AGAVEAEPAGAGEQVSVEVPAEAENAA R EPAVAGDRPELATEATIVVAGGR AAVDSGYYPGQFQVGGQTGK VAPQLTEVIK	57 84 98 107 35	29	4.43	4.71	31690	31700	
220	Rv3029c	BCG3052c	<i>fixA</i>	PROBABLE ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN FIXA		Q <sup>(d)</sup> VPDTSER KLTDGDFLDR LGGDLPPAAVNEIR YDYVTTKPLTAAQR	69 48		4.37	4.20	28080	22400	
64, 65, 80, 172	Rv3406	BCG3476	<i>Rv3406</i>	PROBABLE DIOXYGENASE	268	Q <sup>(d)</sup> VFEKPDFR SFVGLDSHESR VTLM <sup>(a)</sup> GDPVPVYVYQASR VLFEVLQR	28 23 43 33	20	6.44	5.99	32578	32559	
18				NI <sup>‡</sup>									
32				NI <sup>‡</sup>									
41, 43, 44, 45				NI <sup>‡</sup>									
89, 96, 204, 178				NI <sup>‡</sup>									
184, 185, 186				NI <sup>‡</sup>									
222				NI <sup>‡</sup>									

<sup>(a)</sup>Metionina modificada por oxidação<sup>(b)</sup>Triptofano modificado por oxidação<sup>(d)</sup>Peptídeos com modificação da glutamina para ácido piroglutâmico na porção N-terminal.<sup>‡</sup> spots não identificadosObs<sub>1</sub>: Todas as proteínas identificadas pertencem ao gênero *Mycobacterium*Obs<sub>2</sub>: O número Rv indica o gene no genoma de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*Obs<sub>3</sub>: O número BCG indica o gene no genoma de *Mycobacterium bovis* AF2122/97

Tabela 4.4 : Spots protéicos do filtrado de cultura de *M. bovis* BCG Moreau imunogênicamente reconhecidos pelos pools de soros dos indivíduos com baixo e alto níveis de INF $\gamma$  nos diferentes tempos após a revacinação

no. Spot	Rv	Proteínas do Filtrado de Cultura de <i>M. bovis</i> BCG Moreau	Controle			INF $\gamma$ ↓			INF $\gamma$ ↑		
			Tempo zero	Tempo 2 meses	Tempo 12 meses	Tempo zero	Tempo 2 meses	Tempo 12 meses	Tempo zero	Tempo 2 meses	Tempo 12 meses
4	Rv0350	PROBABLE CHAPERONE PROTEIN DNAK (HSP70)	∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
17	Rv2220	GLUTAMINE SYNTHETASE GLNA1	∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
44	Rv2971	PROBABLE OXIDOREDUCTASE	∅	Ir	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
45			∅	Ir	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
52	Rv3804c	SECRETED ANTIGEN 85-A (FBPA)	Ir	Ir	Ir	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
54			Ir	Ir	Ir	∅	Ir	∅	Ir	∅	Ir
55			Ir	Ir	Ir	∅	Ir	∅	Ir	∅	Ir
57			Ir	Ir	Ir	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
58	Rv1886c	SECRETED ANTIGEN 85-B FBPB	∅	Ir	Ir	∅	Ir	∅	Ir	∅	Ir
60	Rv0129c	SECRETED ANTIGEN 85-C (FBPC)	Ir	Ir	Ir	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
61			Ir	Ir	Ir	∅	Ir	∅	∅	∅	Ir
62	Rv3029c	PROBABLE ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN FIXA	Ir	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
67	Rv3803c	MPT51 ANTIGEN PROTEIN FBPD (AG58C)	Ir	Ir	∅	∅	Ir	Ir	Ir	∅	Ir
152			Ir	Ir	∅	∅	Ir	Ir	∅	∅	∅
79	Rv2429	ALKYL HYDROPEROXIDE REDUCTASE D	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir	∅
69	Rv1980c	IMMUNOGENIC PROTEIN MPT64 (ANTIGEN MPT64/MPB64)	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir
158			∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir
94	Rv2873	CELL SURFACE LIPOPROTEIN MPT83 (LIPOPROTEIN P23)	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
93	Rv2875	MAJOR SECRETED IMMUNOGENIC PROTEIN MPT70	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir
94			∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir
95			∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir
96	Rv1984c	PROBABLE CUTINASE PRECURSOR CFP21	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir
109	Rv1926c	IMMUNOGENIC PROTEIN MPT63	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir
128	Rv2626c	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN	Ir	Ir	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
150	Rv0287	ESAT-6 LIKE PROTEIN - ESXG	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
177		NI <sup>‡</sup>	Ir	Ir	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir
178		NI <sup>‡</sup>	Ir	Ir	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir

Ir - Spots protéicos imunoreativos

∅ - Spots protéicos não imunoreativos

NI<sup>‡</sup> - Spots protéicos não identificados por espectrometria de massas

Tabela 4.5 : Spots protéicos da fração de superfície de *M. bovis* BCG Moreau imunogênicamente reconhecidos pelos pools de soros dos indivíduos com baixo e alto níveis de INF $\gamma$  nos diferentes tempos após a revacinação

no. Spot	Rv	Proteínas Associadas à Superfície de <i>M. bovis</i> BCG Moreau	Identificação da proteína	Controle			INF $\gamma$ ↓			INF $\gamma$ ↑		
				Tempo zero	Tempo 2 meses	Tempo 12 meses	Tempo zero	Tempo 2 meses	Tempo 12 meses	Tempo zero	Tempo 2 meses	Tempo 12 meses
17			PROBABLE CHAPERONE PROTEIN DNAK (HSP70)	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
18	Rv0350			∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
22	Rv0440			∅	Ir	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅
23			CHAPERONIN GROEL2 (HSP60)	∅	Ir	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅
24				∅	∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅
25				∅	∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅
32	NI <sup>‡</sup>		NI <sup>‡</sup>	∅	Ir	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
36	Rv0685			∅	Ir	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
37			PROBABLE IRON-REGULATED ELONGATION FACTOR TU (EF-TU)	∅	Ir	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
38				∅	Ir	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
39				∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅	∅
177												
41	NI <sup>‡</sup>			∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
43			NI <sup>‡</sup>	∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
44				∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
45				∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
64	Rv3406			∅	∅	∅	∅	Ir	∅	Ir	Ir	∅
65			PROBABLE DIOXYGENASE	∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
80				∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅	∅
172				∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅	∅
70	Rv1484		NADH-DEPENDENT ENOYL-ACP REDUCTASE	∅	∅	∅	∅	Ir	∅	Ir	∅	∅
89				∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
96			NI <sup>‡</sup>	∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
204				∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
178				∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
100	Rv1732c		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir	∅
129	Rv1926c		IMMUNOGENIC PROTEIN MPT63	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir	∅
151	Rv2875			∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir	Ir
152			MAJOR SECRETED IMMUNOGENIC PROTEIN MPT70	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir	Ir
153				∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir	Ir
158	Rv1980c			∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir	Ir
159			IMMUNOGENIC PROTEIN MPT64	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir	Ir
160				∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ir	Ir
184				∅	∅	∅	Ir	∅	Ir	∅	∅	∅
185			NI <sup>‡</sup>	∅	∅	∅	Ir	∅	Ir	∅	∅	∅
186				∅	∅	∅	Ir	∅	Ir	∅	∅	∅
28	Rv2220		GLUTAMINE SYNTHETASE GLNA1	∅	∅	∅	∅	Ir	Ir	∅	∅	∅
212	Rv2145c		CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN WAG31	∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
218	Rv3028c			∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
219			PROBABLE ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN FIXB	∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
220	Rv3029c		PROBABLE ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN FIXA	∅	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅
222			NI <sup>‡</sup>	∅	∅	∅	Ir	∅	∅	∅	∅	∅
229	Rv0351		PROBABLE GRPE PROTEIN (HSP-70 COFACTOR)	∅	Ir	Ir	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Ir - Spots protéicos imunoreativos

∅ - Spots protéicos não imunoreativos

NI<sup>‡</sup> - Spots protéicos não identificados por espectrometria de massas

#### 4.4 Clonagem, expressão e purificação da região codificante para as proteínas Mpt70, Mpt83, Mpt64 e GlnA1 de *M. bovis* BCG Moreau

##### 4.4.1 Amplificação dos genes selecionados de *M. bovis* BCG Moreau

De modo a obter a região codificante para as proteínas selecionadas, desenhamos os oligonucleotídeos listados na Tabela 3.2. As regiões preditas como codificantes para os peptídeos-sinal foram excluídas das construções, visando a expressão apenas da região codificante para as proteínas maduras. Esses oligonucleotídeos foram utilizados em reações de PCR contendo o DNA genômico de *M. bovis* BCG Moreau (como descrito na metodologia), levando à amplificação de fragmentos de 489 pb, 501 pb, 615 pb e 1434 pb, respectivamente, como mostra a figura 4.15 (A) e (B).

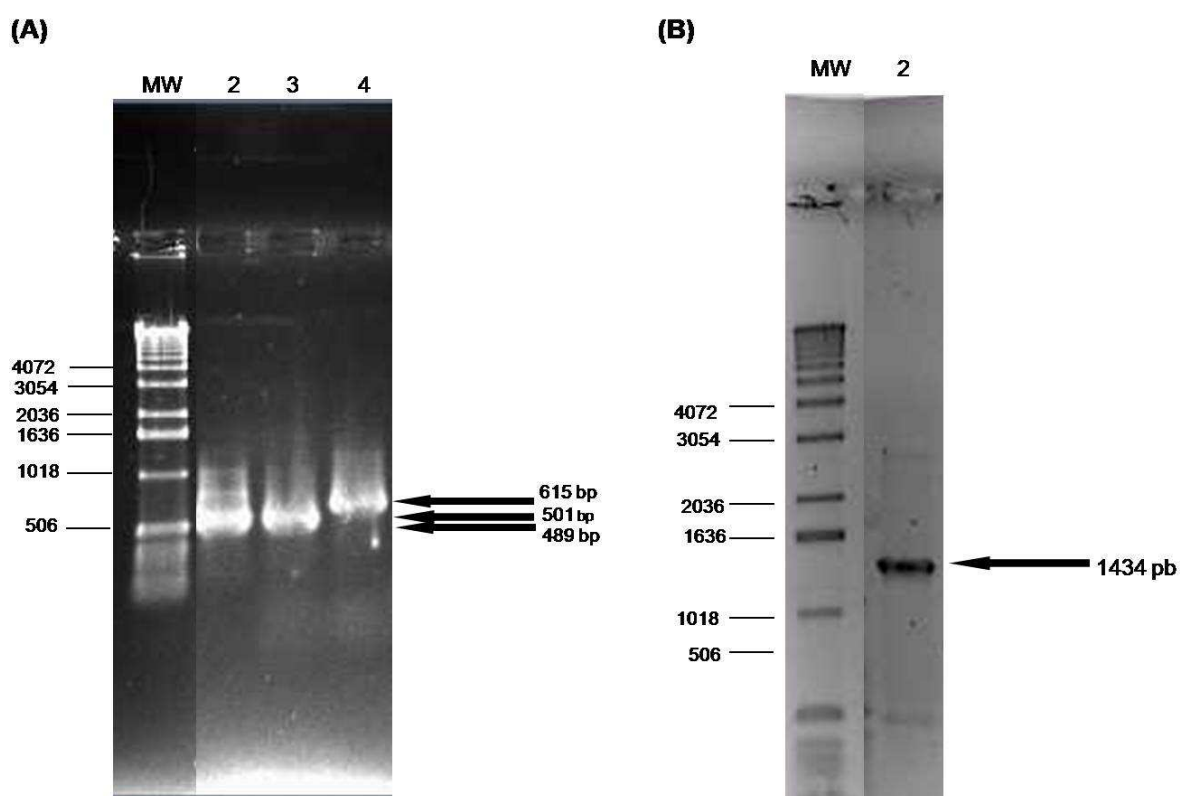


Figura 4.15: Análise em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, para visualização dos fragmentos amplificados por PCR, correspondentes às regiões codificantes para as proteínas, (A) Mpt70 (489 pb – canal 2), Mpt83 (501 pb – canal 3), Mpt64 (615 pb – canal 4) e (B) GlnA1 (1434 pb – canal 2) de *M. bovis* BCG Moreau. (A) e (B) Canal 1: marcador de tamanho molecular “1 Kb DNA ladder Plus” (Invitrogen) indicado na figura, em pares de base (pb).

#### 4.4.2 Subclonagem no vetor de expressão de *E. coli*

Optamos por expressar as proteínas selecionadas no vetor pBAD-Thio/TopoTA (Invitrogen) pois este vetor confere fusão com a proteína tiorredoxina de *E. coli* na região N-terminal da proteína recombinante; esta propriedade do vetor favorece a expressão da proteína heteróloga uma vez que a tiorredoxina é bem traduzida em *E. coli*, favorecendo também a solubilidade da proteína recombinante. O vetor também codifica uma fusão a uma cauda de seis histidinas na porção C-terminal, possibilitando assim a purificação rápida da proteína de fusão no sistema de purificação em pequena escala NI-NTA Magnetic Agarose Beads (Quiagen), por afinidade a metais divalentes.

Os fragmentos de DNA obtidos por amplificação através da técnica de PCR foram purificados com o kit Wizard<sup>®</sup> Plus SV (Promega) e utilizados para ligação ao vetor pBAD-Thio/TopoTA (Invitrogen), conforme especificações do fabricante. A mistura de ligação foi transformada na cepa BL21 de *E. coli* e os transformantes selecionados em meio LB/ágar contendo ampicilina (100 µg/mL). As colônias obtidas foram utilizadas para avaliação rápida da expressão da proteína recombinante, como descrito na Metodologia. Os recombinantes indicados na figura 4.16 (quadrado vermelho) foram escolhidos para posterior caracterização através de seqüenciamento de DNA. Uma vez confirmada a seqüência de DNA, utilizamos estes clones para a purificação das proteínas recombinantes.

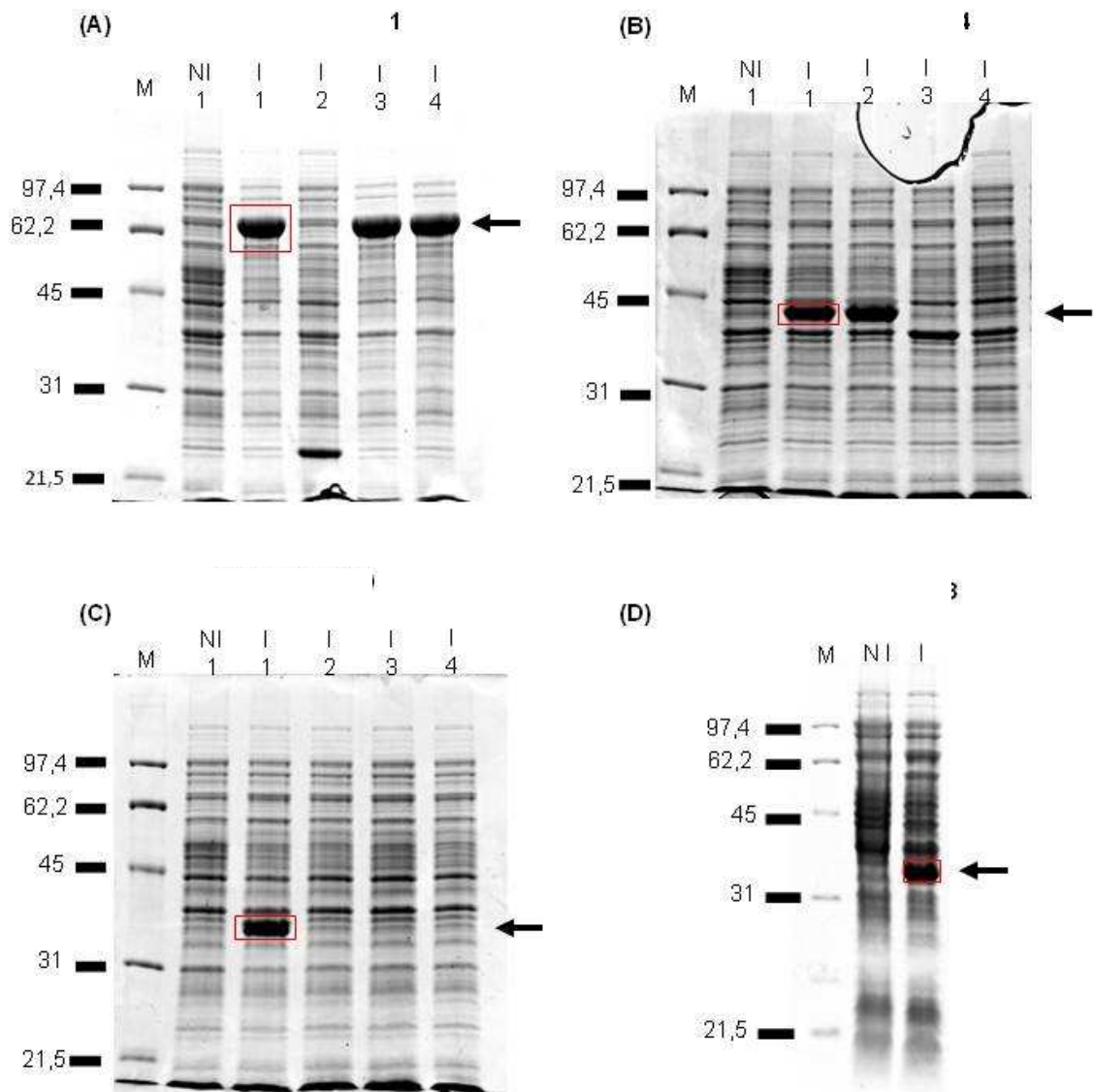


Figura 4.16: Géis SDS-PAGE 12% corados com CBB-R250 para análise rápida da expressão das proteínas recombinantes GlnA1 (A), Mpt64 (B), Mpt70 (C) e Mpt83 (D). O equivalente a 0,1  $DO_{600nm}$  das culturas induzidas (I; 0,02% arabinose) de diferentes transformantes obtidos de cada ligação foi aplicado por canal ao lado da mesma quantidade obtida de uma cultura não-induzida (NI), como controle. As setas indicam a posição esperada de cada proteína recombinante. Marcador de peso molecular (M) indicado à esquerda de todos o géis, em kDa.



#### 4.4.3 Curva de crescimento bacteriano

A partir dos recombinantes selecionados no teste rápido, descrito acima, realizamos curvas de crescimento das cepas portadoras de cada uma das construções, como mostra a figura 4.17. A análise do perfil de crescimento bacteriano revelou que, na presença de 0,02% arabinose, indutor da expressão das proteínas recombinantes, observamos um retardo no crescimento das culturas nas 3 primeiras horas, ao comparar com o comportamento das culturas não induzidas. Fato não observado após aproximadamente 20 horas de indução.

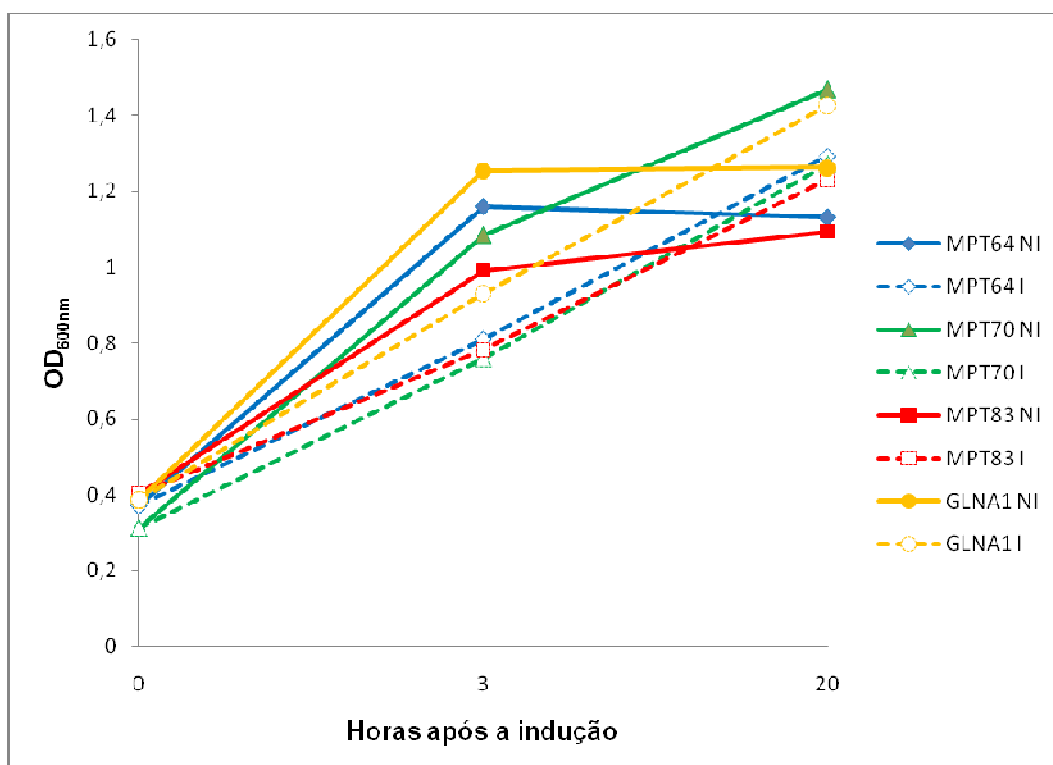
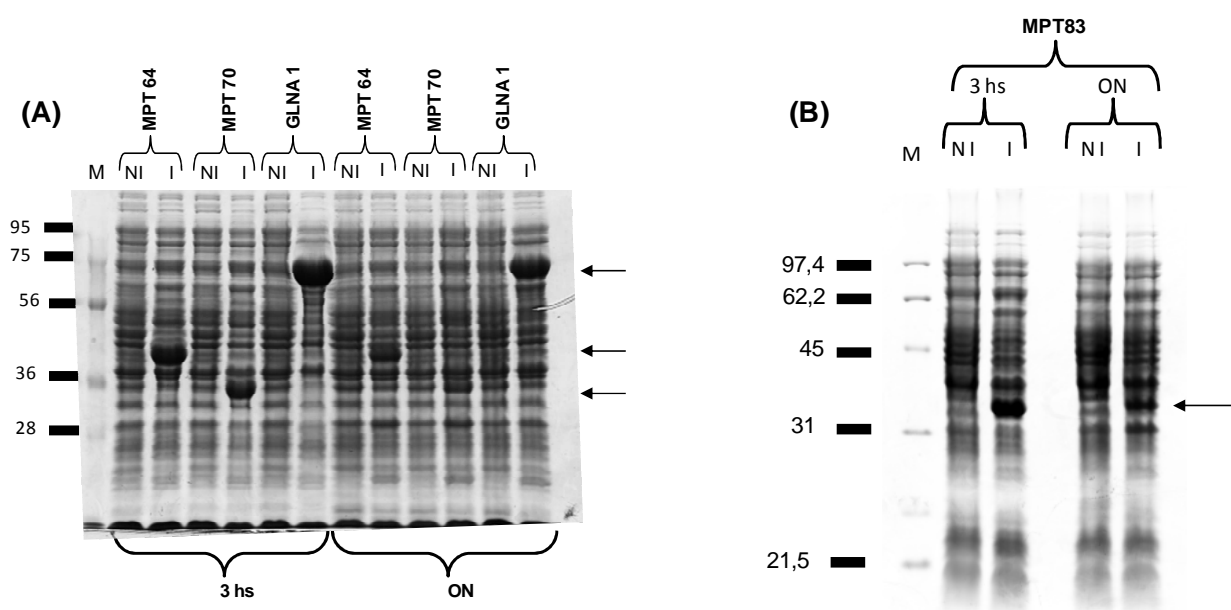


Figura 4.17: Gráfico baseado nos dados obtidos de leituras de D.O. em função dos tempos de indução das bactérias com arabinose 0,02%.NI = Não Induzido e I = Induzido.

## 4.4.4 Avaliação das condições ótimas de expressão das proteínas recombinantes

Tempo de indução

A fim de determinar o melhor tempo de indução para a expressão das proteínas recombinantes, as cepas portadoras das construções pBAD/Thio-Mpt64, pBAD/Thio-Mpt70, pBAD/Thio-Mpt83 e pBAD/Thio-GlnA1 foram induzidas com 0,02% arabinose (p/v), na  $DO_{600nm}$  de 0,4, retirando-se amostras nos tempos 3 horas e cerca de 20 horas após a indução para posterior avaliação por SDS-PAGE, como mostra a figura 4.18. Escolhemos o tempo de 3 horas por demonstrar bons níveis de expressão.



**Figura 4.18:** Géis SDS-PAGE 12% corados com CBB-R250 para análise do melhor tempo de indução visando a expressão das proteínas recombinantes (Mpt64, GlnA1, Mpt70 e Mpt83). Um mL de amostra das culturas foi removido nos tempos 3 horas e cerca de 20 horas após indução com 0,02% arabinose (NI: amostra da cultura antes da adição de arabinose). Após centrifugação, o sedimento bacteriano foi diretamente ressuspensão em tampão de amostra para SDS-PAGE. Um volume de amostra equivalente a 0,1  $DO_{600nm}$  da cultura foi aplicado por poço. As setas indicam as posições das proteínas recombinantes. O tempo de 3 horas foi escolhido para produção das proteínas recombinantes. (A): Mpt64, GlnA1, Mpt70; (B): MPT83. Marcador de peso molecular (M) indicado à esquerda em kDa.

A fusão com a cauda de 6 histidinas na porção C-terminal das proteínas expressas pelas construções selecionadas foi confirmada através de *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-His (1:2500, figura 4.19), levando à visualização de bandas positivas de peso molecular esperado.

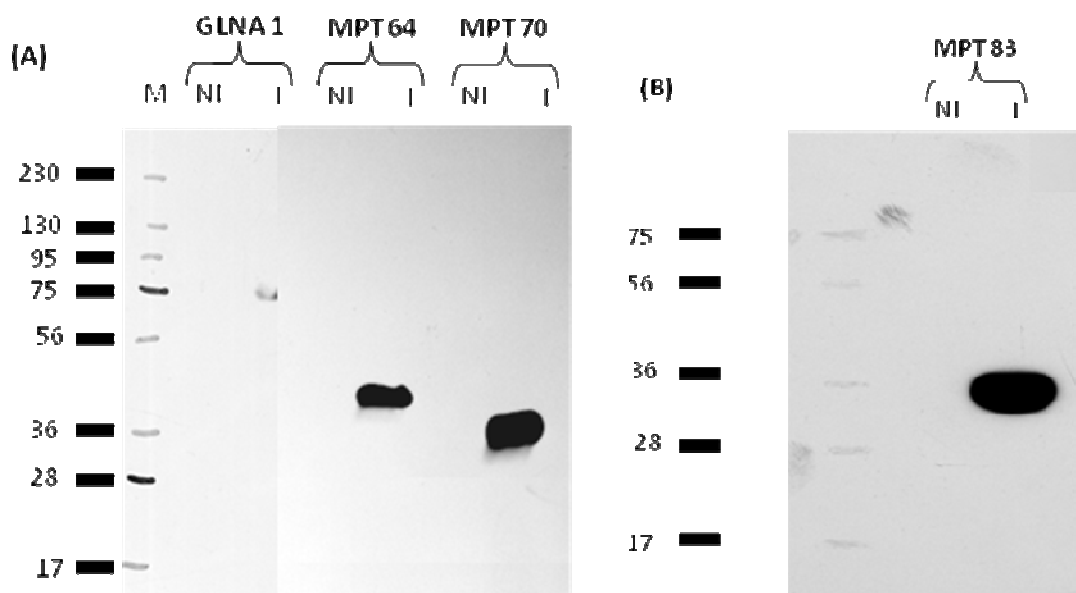


Figura 4.19: *Western Blot* com anticorpo policlonal anti-His 1:2500 e anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase 1:1000 para visualização da expressão das proteínas recombinantes GlnA1, Mpt64, Mpt70 (A) e Mpt83 (B) de *M.bovis* BCG Moreau. Marcador de peso molecular (M) indicado à esquerda, em kDa.

#### Teste de solubilidade da proteína recombinante

Com o propósito de determinar se as proteínas recombinantes estariam sendo expressas sob forma insolúvel, em corpúsculos de inclusão, em *E. coli*, e assim planejar o protocolo de purificação, realizamos um teste de solubilidade como descrito na metodologia. De acordo com o resultado constatou-se que as quatro proteínas recombinantes são majoritariamente expressas na forma insolúvel, em corpúsculos de inclusão (figura 4.20).

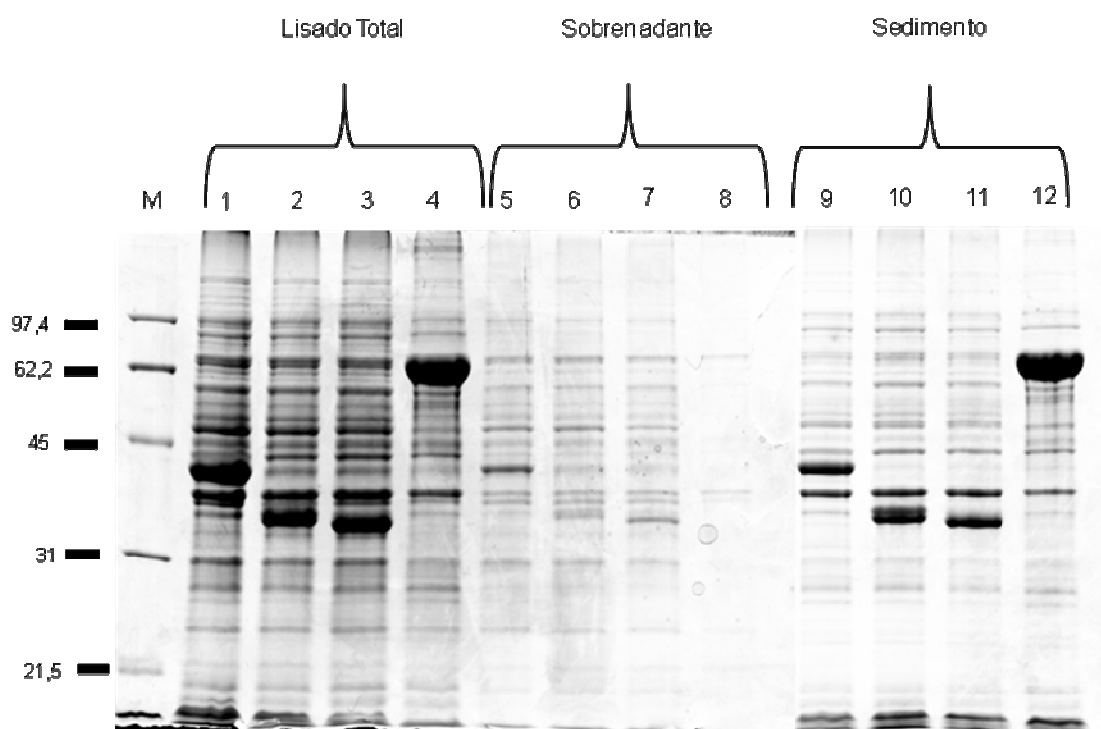


Figura 4.20: Análise da solubilidade das proteínas recombinantes em gel SDS-PAGE 12% corado com CBB-R250. Uma amostra contendo o equivalente a 0,1  $DO_{600nm}$  da cultura original de *E. coli* portadoras das construções para expressões rMpt64 (1, 5 e 9), rMpt70 (2, 6 e 10), rMpt83(3, 7 e 11) e rGlnA1 (4, 8 e 12; (M) Marcador de peso molecular, indicado à esquerda em kDa.

#### 4.4.5 Produção e Purificação das proteínas Mpt64, Mpt70, Mpt83 e GlnA-1

Para realização dos ensaios de WB com os soros individuais dos indivíduos alto e baixo produtores de  $IFN\gamma$  nos tempos 0 e 2 meses após a revacinação, optamos por purificar em pequena escala as proteínas selecionadas a partir dos corpúsculos de inclusão empregando o sistema Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen), facilitando assim o processo de purificação. Cem mililitros de cultura de cada cepa de *E. coli* portadora das construções descritas acima foram induzidos com 0,02% de arabinose (p/v) na  $DO_{600nm}$  de 0,4, por 3 horas a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação, lisadas em tampão contendo lisozima, os corpúsculos de inclusão lavados em tampão contendo Triton X-100 e solubilizados em tampão contendo 8M uréia, para enfim purificarmos as proteínas, como pode ser observado na figura 4.21.

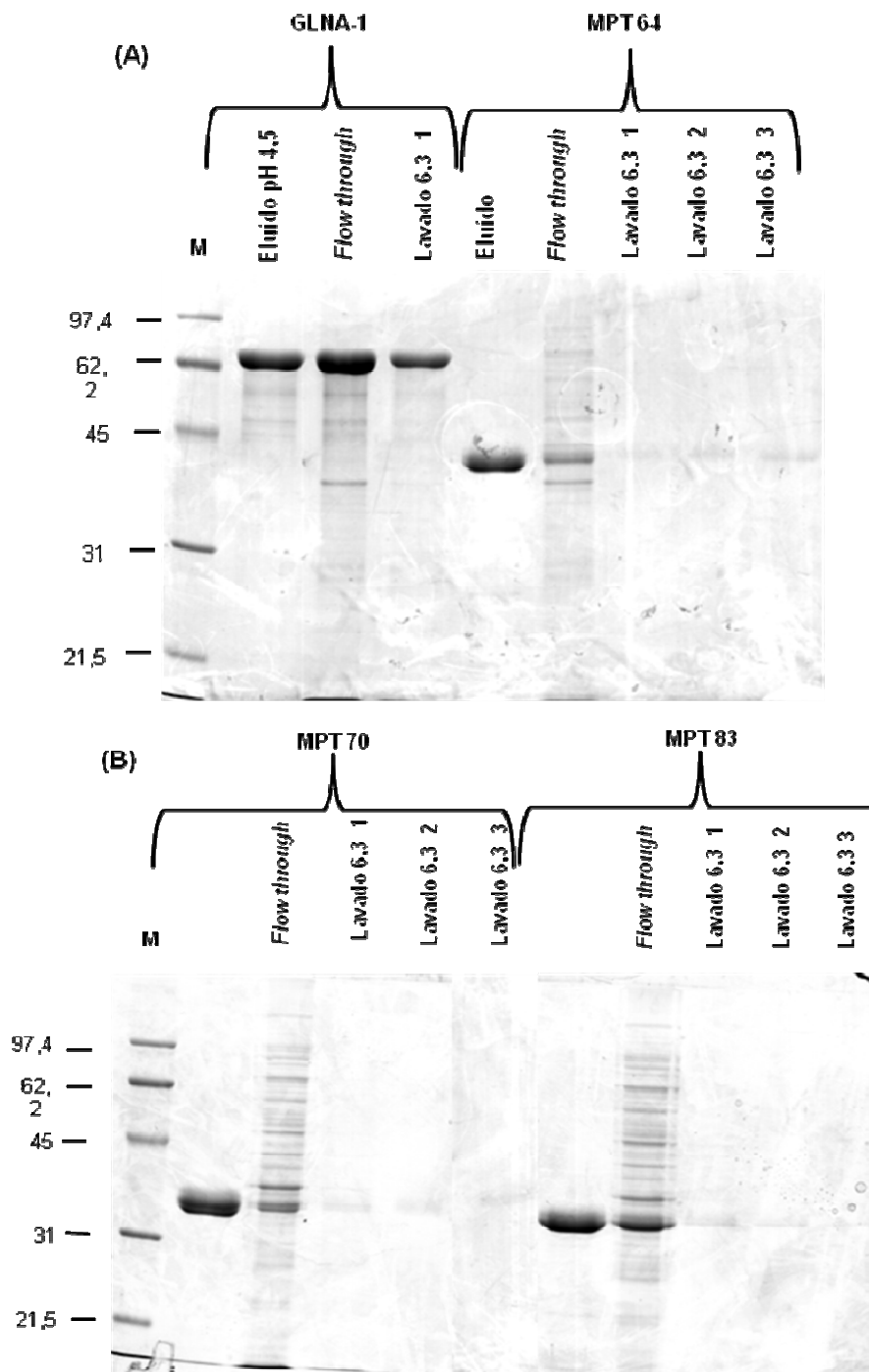


Figura 4.21: Géis SDS-PAGE 12% corados com CBB-R250 para avaliação da purificação das proteínas recombinantes utilizando o sistema NI-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen). As frações “flow through” passaram sem aderir às pérolas de agarose magnéticas. As frações eluídas por diferença de pH estão indicadas na figura. Marcador de peso molecular (M) indicado à esquerda, em kDa

#### 4.4.6 Avaliação da imunoreatividade das proteínas recombinantes

A figura 4.22 mostra a imunoreatividade das proteínas recombinantes GlnA1, Mpt64, Mpt70 e Mpt83 contra os *pools* dos soros dos indivíduos com elevada (A) e baixa produção de IFN $\gamma$  (B). O resultado revelou que apenas os antígenos Mpt70 e Mpt83 foram reconhecidos pelos indivíduos com elevada produção de IFN $\gamma$ . Porém os antígenos Mpt64 e GlnA1, também testados, não apresentaram positividade.

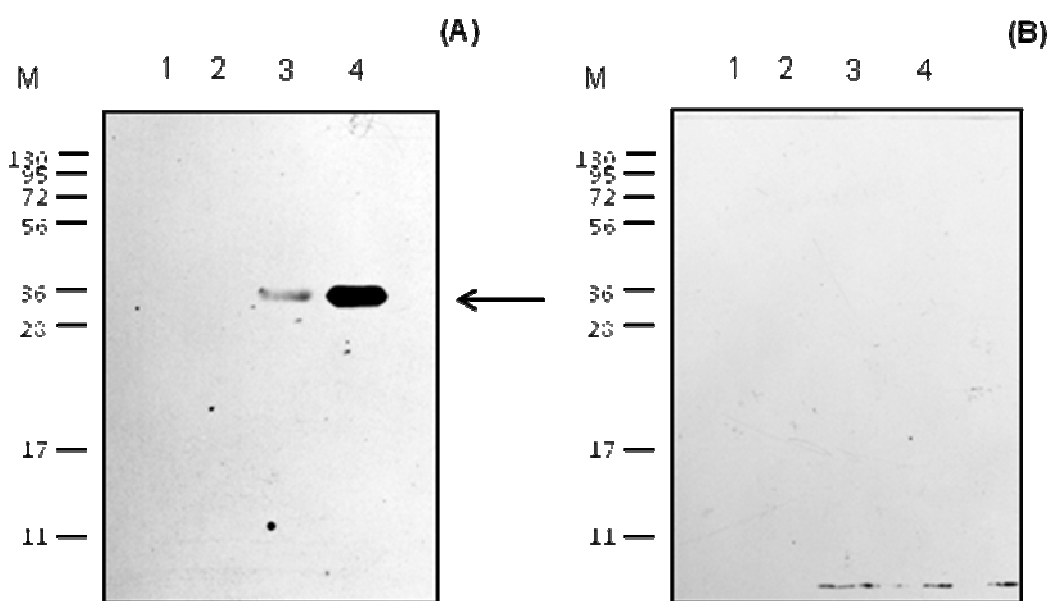


Figura 4.22: *Western Blot* com *pool* de soros dos indivíduos com elevados (A) e baixos (B) níveis de IFN $\gamma$  dois meses após a revacinação, para visualização da reatividade das proteínas recombinantes GlnA1 (1), Mpt64 (2), Mpt70 (3) e Mpt83 (4) de *M. bovis* BCG Moreau. Marcador de peso molecular (M) indicado à esquerda, em kDa.

#### 4.4.7 Titulação dos soros para a realização dos ensaios de WB com as proteínas recombinantes

Para a análise do título ideal dos soros individuais para os ensaios de WB com as formas recombinantes dos antígenos selecionados, empregamos as seguintes diluições 1: 5.000, 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000. Este teste foi realizado com o painel de proteínas recombinantes identificadas em nosso estudo (Apa, GlnA1, Mpt64, Mpt70 e Mpt83). Como controle positivo utilizamos o filtrado de cultura total (FC) e como controle negativo a proteína prolina racemase de *Trypanosoma cruzi*, por ter sido clonada e expressa no mesmo sistema de expressão que as proteínas estudadas (desta forma também possui uma cauda com seis histidinas na porção C-terminal, e uma fusão a tioredoxina no lado N-terminal) (figura 4.23).

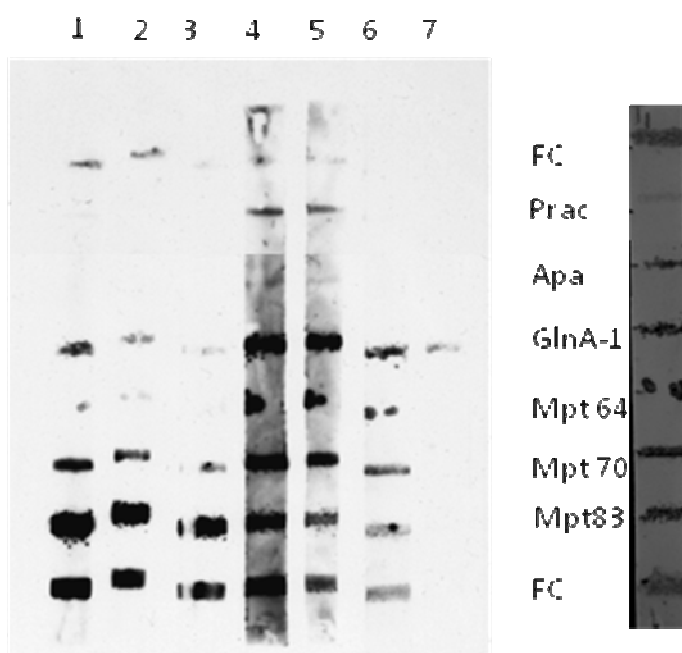


Figura 4.23: *Western Blot* com os soros dos indivíduos 57 (1, 2 e 3) e 56 (4, 5, 6 e 7) com elevado e baixo nível de IFN $\gamma$ , respectivamente, dois meses após a revacinação com BCG Moreau. O filtrado de cultura de BCG Moreau (FC), Prolina racemase de *Trypanosoma cruzi* (Prac), Apa, GlnA1, Mpt64, Mpt70 e Mpt83 de *M. bovis* BCG Moreau foram aplicados na membrana de nitrocelulose empregando Linomat IV (Camag), esta foi corada com Mem Code (a direita na figura). As diluições empregadas foram 1:5.000 (4), 1:10.000 (1 e 5), 1:20.000 (2 e 6) e 1:40.000 (3 e 7) (posição das proteínas recombinantes indicada na figura).

Os resultados mostram que a diluição 1: 40.000 reproduz o perfil diferencial de reconhecimento antigênico observado nos ensaios 2DE-WB. O extrato de proteínas totais presentes no filtrado de cultura de BCG Moreau, como esperado, foi reconhecido pelo soro de ambos os indivíduos estudados. As proteínas Mpt70 e Mpt83 foram reconhecidas apenas pelo indivíduo com elevado nível de IFN $\gamma$  e a GlnA1 pelo indivíduo com baixo nível desta citocina.



## 5 DISCUSSÃO

A proposta central deste trabalho foi avaliar a resposta imune humoral de indivíduos saudáveis PPD negativos, revacinados com BCG Moreau, relacionando esta resposta ao perfil de resposta de produção de IFN $\gamma$  destes indivíduos estudados, buscando possíveis correlatos da proteção oferecida pela cepa vacinal brasileira. Atualmente, diversas evidências indicam que nem o PPD nem a cicatriz vacinal são bons correlatos de imunidade protetora conferida pela vacinação. Além disto, tem se observado a necessidade cada vez maior de correlatos de imunidade protetora em seres humanos, frente ao agente etiológico da tuberculose, o *M. tuberculosis*, e de biomarcadores que estejam associados diretamente a imunogenicidade tanto da vacina em uso, quanto de potenciais candidatos vacinais, e que permitam concomitantemente a avaliação de sua eficácia protetora.

Uma fonte de biomarcadores em potencial são as proteínas extracelulares micobacterianas, associadas à superfície e ativamente secretadas para o meio extracelular. Atualmente, sabe-se que esta fração de proteínas exerce um papel complexo sobre a resposta imune na tuberculose. (Trajkovic, Natarajan e Sharma, 2004). Desta forma, optamos por utilizar esta fração protéica como ponto de partida para avaliarmos seu reconhecimento humoral (IgG-específica) por indivíduos revacinados com BCG Moreau, classificados, previamente, em dois grupos quanto ao perfil de produção de IFN $\gamma$  (alto e baixo) frente à antígenos micobacterianos.

Os resultados obtidos sugerem que os antígenos extracelulares de *M. bovis* BCG Moreau foram capazes de induzir uma resposta humoral, com um perfil de reconhecimento distinto entre os dois grupos de indivíduos avaliados (alto e baixo produtores de IFN $\gamma$ ). Sabendo que o IFN $\gamma$  ainda é considerado um correlato de proteção, os antígenos reconhecidos exclusivamente pelos indivíduos produtores de elevados níveis desta citocina podem, portanto, vir a ser prováveis alvos para o desenvolvimento de testes, baseados na presença de anticorpos, capazes de distinguir entre indivíduos protegidos ou não pela vacinação com *M. bovis* BCG Moreau.

Entretanto, sabemos que a resposta imune humoral dos indivíduos estudados frente aos antígenos extracelulares de BCG Moreau não indica, necessariamente, uma capacidade direta destes antígenos em ativar células T. A utilização de *pools* de soros IgGs-purificadas para os ensaios de 2DE-WB, assegura que a proteína

soro reativa contenha epítomos para células T, visto que a IgG participa da opsonização de bactérias que serão fagocitados por macrófagos e neutrófilos, e da ativação citotóxica mediada por células (Da Fonseca *et al.*, 2001). Logo, o padrão heterogêneo de reconhecimento sorológico de antígenos observado neste trabalho, poderia refletir também uma ativação diferencial de células-T.

## 5.1 Padronização das condições experimentais para os ensaios de 2DE-WB

### 5.1.1 Obtenção da fração protéica de superfície

A metodologia empregada para obtenção da fração de superfície foi a dispersão dos agregados oriundos da nata micobacteriana por agitação mecânica com pérolas de vidro, que permite a liberação das proteínas não-covalentemente associadas à superfície, descrita inicialmente em 1966 (Buttiaux *et al.*, 1966). Ortalo-Magné e colaboradores (1995) empregando tal metodologia demonstraram que esta provoca extração efetiva dos componentes extracelulares e pouco rompimento celular. Desta forma, utilizamos uma adaptação do protocolo de Ortalo-Magné e colaboradores (1995), previamente padronizado em nosso laboratório (Pagani TD, 2008). Embora esta metodologia não pareça afetar a integridade celular, dentre os *spots* imunoreativos identificados, observamos a proteína GlnA1 (*spot* 17 no FC e 28 na SF), uma enzima essencialmente citosólica, porém já descrita na literatura por estar também presente no ambiente extracelular; sua importância e localização serão abordados mais adiante.

Devido ao elevado teor lipídico do envelope celular micobacteriano, que poderia interferir na focalização isoeétrica e nas reações de 2DE-WB, sobretudo os lipídios dada sua alta imunogenicidade bastante relatada na literatura (Watanabe *et al.*, 2006), inicialmente testamos o fracionamento destas proteínas com Triton X-114 seguida de sua precipitação com 15% TCA em acetona, conforme descrito em materiais e métodos. Apesar desta metodologia se revelar eficaz na remoção de interferentes, o manuseio excessivo da amostra levou a uma perda significativa, comprometendo a realização dos ensaios de 2DE-WB. Para reduzir a manipulação da amostra, realizamos a precipitação direta das proteínas, e incluímos uma etapa adicional de focalização isoeétrica das proteínas em solução, empregando para isto o aparato Zoom<sup>®</sup> IEF *fractionator*.

### 5.1.2 Focalização isoeletrica preparativa

Neste estudo demonstramos que a realização prévia da focalização isoeletrica preparativa (Zoom<sup>®</sup> IEF *Fractionator* - Invitrogen) para ambas as frações proteicas proporcionou uma redução do elevado teor lipídico, fortemente imunogênico, representado em sua maior parte pelo LAM (Watanabe *et al.*, 2006). Este fracionamento se mostrou extremamente benéfico, especialmente para a fração de proteínas associadas à superfície, onde existe uma maior concentração de lipídios resultando em um elevado *background*, que mascarava as proteínas imunorreativas localizadas na faixa de pI e massa molecular correspondente a estes interferentes. A redução destes interferentes resultou em uma melhor visualização e interpretação dos resultados de 2DE-WB.

A IEF preparativa ao separar misturas complexas de proteínas em frações distintas, minimizou também a agregação e precipitação proteica. Somado a isto, esta separação permitiu a utilização de uma maior concentração de proteínas (100 µg) dentro da faixa de pH de interesse (pH 4–7). Para isto, as 4 primeiras frações resultantes da focalização preparativa (pH 3–4,2; 4,2–5,4; 5,4–6,2; 6,2–7) foram reunidas e aplicadas, subseqüentemente, sobre a tira de IPG. A redução da precipitação/agregação de proteínas através deste método já havia sido reportada por Zuo e colaboradores (2001) que avaliaram a sua aplicabilidade para a análise proteômica de tecidos e fluidos fisiológicos de mamíferos.

O emprego da focalização isoeletrica em solução beneficiou este estudo em diversos aspectos como mencionado acima. Além disto, observamos também uma melhor separação das proteínas, que resultou, satisfatoriamente, em uma maior resolução das proteínas pouco abundantes, minimizando um dos aspectos limitantes no estudo imunoproteômico, que é a detecção de proteínas pouco abundantes.

Dados da literatura têm mostrado que esta metodologia apresenta um maior rendimento, uma separação mais eficiente das proteínas e uma redução da contaminação cruzada de proteínas entre as frações obtidas, quando comparada a outros métodos de pré-fracionamento, como as técnicas de cromatografia, facilitando as análises quantitativas e qualitativas (Zuo e Speicher, 2000).

## 5.2 Imunoproteoma como ferramenta para análise da resposta humoral

A imunoproteômica atualmente é uma ferramenta muito utilizada na busca de biomarcadores. Todavia, é importante mencionar que para sua realização é necessário que as proteínas sofram um processo de desnaturação que poderia resultar na perda de epítopos presentes em seu estado nativo. Neste trabalho provavelmente estamos identificando epítopos lineares, pois estes mantêm sua imunorreatividade a despeito do processo de desnaturação. Contudo, os epítopos conformacionais provavelmente não podem ser detectados por este método. Apesar desta limitação optamos pela análise 2DE-WB em nosso trabalho, visto que os antígenos, individualmente, são melhores resolvidos por este método.

A imunoproteômica não fornece uma abordagem precisa com relação à quantidade exata de cada proteína representada por um *spot* no gel corado ou à de anticorpos antígeno-específicos observados no *imunoblot*. Isto ocorre devido a uma variação na capacidade das proteínas de se ligarem a corantes e porque a exata quantificação de anticorpos séricos antígeno-específicos é extremamente limitada.

Outra limitação da técnica observada foi a dificuldade no alinhamento dos *spots* protéicos no gel de referência com os mesmos nos *imunoblots*. Além disto, a sensibilidade de detecção muito superior proporcionada pela reação da peroxidase, seguida de detecção por quimioluminescência, quando comparada com a sensibilidade da coloração com CBB G-250, mostrou que alguns antígenos (como por exemplo, os *spots* 177 e 178 observados no 2DE-WB do FC dos indivíduos controles em todos os 3 tempos estudados e IFN $\gamma$  alto no tempo 2 meses), foram evidenciados no *imunoblot*, porém não visualizados no gel de referência, impedindo sua identificação.

Observamos também que algumas proteínas produziram mais de um *spot* com diferentes pIs e/ou massas moleculares, aparecendo nos géis de referência (FC e SF) como uma cadeia de pontos. Os diferentes *spots* relativos a uma mesma proteína podem apresentar diferenças em antigenicidade, resultando em *spots* com reconhecimentos distintos no *imunoblot*. Esta situação pode ser explicada em parte, pela diferença na concentração relativa das proteínas nas amostras estudadas e ou dos anticorpos presentes no soro dos indivíduos analisados. Outra possibilidade para este reconhecimento diferencial pode envolver diferenças relativas aos epítopos das várias isoformas. Observamos esta situação para algumas proteínas

descritas abaixo (figura 4.9 e tabelas 4,4 e 4,5) tanto na fração FC quanto na SF onde apenas alguns *spots* apresentaram imunoreatividade.

Dentre as proteínas consideradas de maior relevância, identificadas neste trabalho, a Mpt64 (*rv1980*), Mpt70 (*rv2875*) Apa (*rv1860*), Ag85A (*rv3804c*), Ag85C (*rv0129c*) e Mpt51 (*rv3803c*) foram identificadas em mais de um *spot* com diferentes massas moleculares e pontos isoelétricos. Isto provavelmente reflete a ação de proteases ou modificações pós-traducionais como amidação, glicosilação, fosforilação ou outras. Para as proteínas Mpt64 e Mpt70, em ambas as frações analisadas, observamos imunorreatividade em todos os *spots* visualizados, sugerindo que os epítomos reconhecidos pelos anticorpos dos indivíduos analisados estão localizados no cerne das proteínas e não em locais de prováveis modificações.

A proteína Apa, tanto no FC quanto na fração de SF, foi identificada em 4 *spots* (Bêrredo-Pinho, manuscrito em preparação), entretanto, aparentemente apenas dois *spots* do FC (*spots* 13 e 14) foram reconhecidos pelo *pool* de soros de indivíduos revacinados, alto produtores de IFN $\gamma$  um ano após a revacinação. Possivelmente, isto pode ser consequência de modificações pós-traducionais, como glicosilação, já descrita para esta proteína (Dobos *et al.*, 1995), ou devido a possíveis alterações conformacionais que resultaram em um padrão de reconhecimento diferencial pelo sistema imune. Malen e colaboradores (2007), ao analisarem a reatividade dos antígenos presentes no filtrado de cultura de *M. tuberculosis* H37Rv com um *pool* de soros de pacientes com tuberculose, também observaram a mesma situação para esta proteína. No entanto, estudos adicionais fornecerão melhor compreensão deste fenômeno.

Outra peculiaridade de nosso estudo foi o agrupamento em *pools* dos soros dos indivíduos avaliados (revacinados alto e baixo produtores de IFN $\gamma$  e controles não revacinados), nos tempos analisados (tempo 0, antes da revacinação e 2 e 12 meses após a revacinação), conforme sua classificação. Optamos pela utilização de *pools* visto que nosso objetivo consistiu em identificar antígenos capazes de serem reconhecidos pelo conjunto de indivíduos em cada grupo analisado, e não específicos a apenas um indivíduo. Entretanto, a utilização de soros agrupados pode levar a uma interpretação incorreta dos resultados, visto que a abundância e a afinidade de anticorpos presentes nos soros individuais podem variar fortemente. Todavia, a sororeatividade observada para o *pool* provavelmente reflete aquela presente na maior parte dos soros contidos no *pool*. A diluição de anticorpos

presentes em apenas um ou em poucos soros incluídos nos *pools*, pode prejudicar a detecção de proteínas imunorreativas, e esta pode ser uma das razões porque não identificamos alguns antígenos reconhecidamente imunogênicos, presentes em ambas as frações protéicas estudadas. O custo e dificuldades inerentes à abordagem escolhida (2DE-WB) também inviabilizariam a análise individual dos 94 soros incluídos neste estudo. Assim, após a seleção de antígenos diferenciais, utilizando *pools* de soros realizamos ensaios com os soros individualizados, empregando as proteínas identificadas sob forma recombinante, a fim de confirmar a resposta humoral observada. Conforme sugerido por outros autores (Hass *et al.*, 2002), uma extensa análise das proteínas antigênicas reconhecidas com soros individualizados pode melhor avaliar a identificação e aplicabilidade destas como marcadores diagnóstico, potenciais candidatos vacinais e como correlatos de proteção vacinal.

### **5.3 Imunoproteoma Comparativo das proteínas extracelulares de *M. bovis* BCG Moreau**

A comparação dos padrões de reconhecimento de antígenos extracelulares de BCG Moreau pelos *pools* de soros dos diferentes grupos avaliados mostrou um perfil geral claramente distinto. As figuras 4.7 e 4.8 mostram, respectivamente, o perfil de proteínas do FC e da SF reconhecidos pelo *pool* de soros dos indivíduos controle (painéis A, D e G), indivíduos com baixos níveis de IFN $\gamma$  (painéis C, F e I) e alto produtores desta citocina (painéis B, E e H). Estes resultados mostram que tanto para a fração do FC quanto para a de SF, os soros de indivíduos com altos níveis de IFN $\gamma$  reconheceram preferencialmente proteínas com peso molecular entre 28-11 kDa e ponto isoelétrico (pI) entre 4.0-5.0. Já os indivíduos baixo produtores de IFN $\gamma$  reconheceram proteínas com peso molecular acima de 28 kDa, e estas apresentaram uma variação de pI entre 5.0-6.0. Este perfil imunoproteômico foi observado dois meses após a revacinação e perdurou até 12 meses.

Ao examinarmos em conjunto o padrão imunoproteômico com os respectivos géis de referência da fração do FC e de SF corados com CBB (figura 4.9, painéis A e B, respectivamente), observamos que o número de *spots* imunorreativos foi substancialmente inferior ao número total de *spots* observados nos géis, correspondendo a aproximadamente 7% das proteínas do FC e 9% das de SF

visualizadas. A presença de anticorpos contra antígenos presentes no filtrado de cultura sugere que, *in vivo*, após a vacinação, tais antígenos se encontram rapidamente disponíveis para o reconhecimento pelo sistema imune.

#### **5.4 Imunoproteoma diferencial das proteínas extracelulares de *M. bovis* BCG Moreau**

Ao analisarmos comparativamente os padrões da resposta humoral dos três diferentes grupos de indivíduos, 2 e 12 meses após a revacinação, na busca de possíveis biomarcadores correlacionados com a resposta protetora oferecida pela vacina BCG Moreau, os *spots* escolhidos como de maior interesse foram aqueles reconhecidos exclusivamente pelos indivíduos classificados como alto produtores de IFN $\gamma$ , já no tempo de dois meses, e que mantiveram sua positividade 1 ano após a revacinação.

Apesar dos resultados revelarem um perfil distinto de reconhecimento antigênico, os soros provenientes dos 3 grupos de indivíduos em todos os tempos avaliados, apresentaram reatividade para os antígenos membros do complexo Ag85 (FbpA, FbpB, FbpC e Mpt51). Este reconhecimento homogêneo, inclusive pelo controle não revacinado, provavelmente reflete a exposição prévia a micobactérias ambientais, ao fato dos indivíduos terem feito dois testes PPDs consecutivos, ou ainda a resquícios da vacinação com BCG na infância. O complexo Ag85 possui atividade de micolil-transferase, participando na síntese de ácidos micólicos, estrutura necessária para manutenção da integridade da parede celular, e é uma das proteínas responsáveis pela afinidade das micobactérias à fibronectina (Belisle *et al.*, 1997).

Nossos dados corroboram com os obtidos por Samanich, Belisle e Laal (2001), e Malen, Søfteland e Wiker (2007) que, ao avaliarem as proteínas presentes no filtrado de cultura de *M. tuberculosis* H37Rv frente a um *pool* de soros de pacientes com tuberculose e indivíduos saudáveis, visando identificar potenciais candidatos a métodos diagnóstico, também verificaram a sororeatividade das proteínas do complexo Ag85, inclusive nos indivíduos saudáveis. Diversos estudos têm demonstrado que o *M. tuberculosis* possui muitas proteínas com significativa homologia com proteínas análogas em outras espécies de micobactérias e procariotos (como revisto por Laal, 1994); além disso, mostram que quase todos os indivíduos (saudáveis ou doentes) possuem anticorpos em resposta à exposição a

bactérias comensais, ambientais, e outras vacinações, que podem apresentar reatividade cruzada com diversos antígenos de *M. tuberculosis* (Laal et al., 1997). Frente à homologia existente entre o *M. tuberculosis* e o *M. bovis* BCG, provavelmente anticorpos que possuem reatividade com antígenos do complexo Ag85 de *M. tuberculosis* também reagem com os de *M. bovis* BCG. Assim, os membros deste complexo, por induzirem resposta imune tanto em indivíduos saudáveis (não revacinados) quanto em revacinados e doentes, não constituem potenciais candidatos a correlatos de proteção oferecida pela vacina. Porém, a aplicabilidade vacinal de tais antígenos tem sido descrita, inclusive sob a forma de vacina de DNA e em protocolos de *prime-boost* (Tanghe et al., 2001; Romano et al., 2006).

Com relação ao imunoproteoma diferencial do FC, os antígenos Mpt63 (*spot* 109), Mpt64 (*spots* 69 e 158) Mpt70 (*spots* 93, 94 e 95), Mpt83 (*spots* 94) e Cfp21(*spot* 96) foram reconhecidos apenas pelos indivíduos classificados como altos produtores de IFN $\gamma$  nos tempos 2 e 12 meses após a revacinação. Já a proteína Apa (*spots* 13 e 14) só foi reconhecida pelo soro destes indivíduos no tempo de 12 meses após revacinação. Quanto ao imunoproteoma diferencial da SF, somente as proteínas Mpt64 (*spots* 158,159 e 160 ) e Mpt70 (*spots* 151,152 e 153) foram identificadas pelo mesmo grupo, nos mesmos tempos.

Estas proteínas serão descritas individualmente adiante:

#### **5.4.1 Proteínas imunogênicas Mpt 70 (*rv2875*) e Mpt83 (*rv2873*)**

Neste trabalho as proteínas Mpt70 e Mpt83 se revelaram como possíveis correlatos de proteção contra a tuberculose oferecida pela vacina BCG Moreau, por terem sido reconhecidas apenas pelos indivíduos com altos níveis de IFN $\gamma$  em ambas as frações estudadas nos tempos 2 e 12 meses após a revacinação. Este reconhecimento acompanhou as diferenças na resposta celular, avaliada através da dosagem desta citocina induzida por antígenos micobacterianos (Oliveira, 2009). Além disto, estes antígenos não apresentaram reatividade cruzada com o grupo controle (não revacinado).

Estas proteínas estão entre os antígenos micobacterianos mais estudados, estando presente nos membros do complexo *M. tuberculosis*. São secretadas via sec-dependente, sendo a Mpb70 uma proteína solúvel, clivada pela peptidase sinal



I, enquanto a Mpb83 é uma lipoproteína glicosilada processada pela peptidase sinal II (Wiker, 2009).

Estudos *in vitro* com *M. bovis* e *M. tuberculosis* mostraram que estes organismos são capazes de secretar estes antígenos em níveis muito distintos, constituindo-se esta, uma notável diferença fenotípica entre eles (Hewinson *et al.*, 1996). Enquanto *M. bovis* produz abundantemente estas proteínas, *M. tuberculosis* as expressa em quantidades ínfimas. A produção destas proteínas por cepas de *M. bovis* BCG é também bastante variável (Wiker *et al.*, 1996). Cepas de BCG obtidas antes de 1927 (Tokyo, Moreau, Russia, Sweden, Birkhaug, Romania), produzem estas proteínas em níveis elevados quando comparado às cepas obtidas após este período (Pasteur, Danish, Glaxo, Tice e Beijing), onde a produção é extremamente baixa (Charlet *et al.*, 2005). Vale ressaltar que em BCG Moreau tais proteínas representam mais de 10% das proteínas do filtrado de cultura (Miura *et al.*, 1983).

Charlet e colaboradores (2005) mostraram que uma mutação pontual no codon de início de tradução do fator de transcrição SigK é reponsável pela reduzida expressão destas proteínas em diversas cepas de BCG. No entanto, a produção diferencial entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* está associada a uma mutação no gene *rv0444*, que codifica um fator anti-sigK, um repressor, que atua sobre o SigK inibindo sua atividade (Missiakas e Raina, 1998; Bashyam e Hasnain, 2004). Apesar dos baixos níveis de expressão destes antígenos em *M. tuberculosis*, diversos trabalhos relatam que, durante a infecção por *M. tuberculosis*, estas proteínas estimulam tanto a resposta imune celular quanto humoral (Billman-Jacobe *et al.*, 1990; Harboe *et al.*, 1990, Lightbody *et al.*, 2000, Mustafa *et al.*, 1998, Roche *et al.*, 1994, Oettinger *et al.*, 1999). Logo, mesmo não sendo observada no FC de *M. tuberculosis* H37Rv cultivado em meio axênico, acredita-se que seu gene seja regulado positivamente durante a infecção *in vivo*, dada a constatação de reatividade de pacientes frente a estes antígenos.

Cosgrove e colaboradores, em 2006, observaram que a revacinação com BCG Moreau via oral em adultos previamente vacinados com BCG-Glaxo resultou em um aumento expressivo da resposta celular (produção de IFN $\gamma$ ) frente às proteínas purificadas Ag85 e Mpb70, mostrando que a revacinação com BCG Moreau foi capaz de suscitar um *boosting* da vacinação anterior e que o antígeno Mpb70 está envolvido neste processo.

Dada a extensa homologia entre as proteínas Mpb70 e Mpb83, é esperado que os anticorpos desenvolvidos sejam dirigidos contra epítomos menos específicos.

Uma vez que a Mpb83 é uma lipoproteína exposta na superfície (Lounatmaa e Brander, 1990; Hewinson *et al.*, 1996; Vosloo *et al.*, 1997; Harboe *et al.*, 1998) e que a Mpb70 é eficientemente secretada como proteína solúvel (Wiker, Harboe e Nagai, 1991), estudos de cinética e especificidade do desenvolvimento de anticorpos contra estas proteínas poderão fornecer novas informações a respeito do seu possível papel como correlato de proteção oferecida pela vacina BCG Moreau.

#### 5.4.2 Proteína Imunogênica Mpt63 (*rv1926c*)

A proteína Mpt63 foi identificada como diferencialmente reconhecida no imunoproteoma do FC, sendo observada apenas nos 2DE-WB com soro dos indivíduos classificados como alto produtores de IFN $\gamma$ , nos tempos 2 e 12 meses após a revacinação. Com relação ao imunoproteoma de SF, esta proteína também foi reconhecida pelos soros do mesmo grupo de indivíduos e tempos descritos acima, sendo observada inclusive no tempo 0, antes da revacinação. Este reconhecimento humoral prévio à revacinação com BCG Moreau pode ser consequência dos dois testes PPD consecutivos utilizados na seleção dos indivíduos incluídos neste estudo, a resquícios da imunidade oferecida pela primeira vacinação com BCG, ou à reação cruzada devido à exposição a micobactérias ambientais.

A proteína Mpt63 é codificada por um gene (*mpt63*) presente apenas em espécies do complexo *M. tuberculosis*. Esta especificidade, somada aos dados da literatura que mostram que anticorpos policlonais contra esta proteína não reagem de forma cruzada com proteínas de micobactérias ambientais como *Mycobacterium avium*, a sugerem como um alvo em potencial para o diagnóstico tanto da TB humana quanto bovina (Kawajiri, 2003; Wang *et al.*, 2005; Lyashchenko *et al.*, 1998). Raja e colaboradores, em 2006, verificaram através de imunoblot o reconhecimento da Mpt63 apenas pelo *pool* de soros de pacientes com TB e não pelo grupo controle. Estes resultados corroboram com os dados de 1998, de Oftung e colaboradores, que observaram, com base no reconhecimento por células-B, que este antígeno possui epítomos restritos ao complexo *M. tuberculosis*.

Quanto à resposta imune humoral induzida por esta proteína, há relatos na literatura utilizando modelos animais, que tanto a proteína purificada a partir do filtrado de cultura de Mtb (Nagai *et al.*, 1991) quanto a infecção com Mtb virulento, foram capazes de elicitar uma forte produção de anticorpos específicos para este

antígeno. Embora já existam diversas informações com relação à resposta humoral induzida por esta proteína em diferentes espécies de animais e seres humanos, dados relacionados à resposta celular  $T_H1$  induzida por este antígeno são quase inexistentes, particularmente em indivíduos vacinados com BCG e infectados e não-infectados com *M. tuberculosis*. No entanto, recentemente, um estudo feito em indivíduos saudáveis vacinados com BCG avaliou o efeito da Mpt63 na proliferação e na secreção de  $IFN\gamma$  por PBMC. Os resultados mostraram que a Mpt63 induziu uma moderada reatividade das células  $T_H1$ , equivalente a reatividade induzida por outros antígenos secretados de *M. tuberculosis* (Mustafa, 2009).

#### 5.4.3 Proteína Secretada Rica em Alanina e Prolina (Apa, rv1860)

A proteína Apa apresentou imunoreatividade somente contra os soros de indivíduos classificados como alto produtores de  $IFN\gamma$  um ano após a revacinação, e apenas na fração FC. Embora identificada no mapa proteômico da fração SF, esta proteína não demonstrou imunorreatividade nas condições empregadas. Esta ausência de reconhecimento pode ser devido a uma distinta antigenicidade entre as frações, ou ainda a expressão diferenciada entre as duas amostras protéicas estudadas, visto que na fração FC tal proteína possui maior expressão do que na SF no tempo de cultivo empregado, segundo observado nos mapas proteômicos de ambas as frações, confeccionados em nosso laboratório (Pagani TD, 2008; Bêrredo-Pinho, manuscrito em preparação).

Este complexo antigênico com massa molecular de 45/47 kDa é composto de proteínas manosiladas com até 9 glicoisofomas (Horn *et al.*, 1999; Romain *et al.*, 1999). A Apa foi originalmente identificada e isolada no filtrado de cultura de BCG, por meio de sua capacidade de interagir principalmente com linfócitos T e / ou anticorpos induzidos pela imunização de cobaias com BCG vivo. Estes resultados indicam que esta proteína, que representa menos de 2% das proteínas liberadas ou excretadas durante o crescimento do BCG, são antígenos dominantes durante a imunização com BCG (Romain *et al.*, 1993; Laqueyrierie *et al.*, 1995). A presença dos resíduos de manose na proteína Apa é essencial para a antigenicidade desta molécula na resposta imune dependente de célula T, *in vivo* e *in vitro*, como demonstrado pela reduzida capacidade do antígeno deglicosilado em ativar reações de hipersensibilidade tardia em porquinhos da Índia imunizados com BCG, o mesmo

sendo constatado para as formas recombinantes expressas em *E. coli* e *M. smegmatis* (Horn *et al.*, 1999; Romain *et al.*, 1999)

Subseqüentemente, a resposta humoral à Apa foi verificada preferencialmente em pacientes com tuberculose, mas não em indivíduos saudáveis PPD-positivos (Espitia *et al.*, 1995). Quanto à resposta celular, já foi demonstrado que esta proteína é capaz de suscitar tanto resposta linfoproliferativa quanto produção de IFN $\gamma$  pelo PBMC de indivíduos PPD positivos, com diferenças significativas nos níveis de resposta entre os controles saudáveis e pacientes (Kumar *et al.*, 2003).

#### **5.4.4 Provável Precursor da Cutinase - Cfp21 (*rv1984c*) e Proteína Imunonogênica Mpt64 (*rv1980c*)**

As proteínas Cfp21 e Mpt64 foram também reconhecidas exclusivamente pelo *pool* de soros dos indivíduos classificados como alto produtores de IFN $\gamma$ , nos tempos 2 e 12 meses após a revacinação. O reconhecimento da Mpt64 foi observado em ambas as frações protéicas analisadas (FC e SF), ao passo que para Cfp21 este reconhecimento ocorreu apenas na fração de FC. O não reconhecimento desta proteína na SF de BCG Moreau pode ser devido a sua ausência nesta fração, visto que até o momento, não foi identificada no mapa proteômico (Pagani TD, 2008). Estas proteínas são codificadas pelos genes *rv1984c* e *rv1980c*, respectivamente, localizados na região de diferença RD2 descrita previamente, deletada nas cepas de BCG derivadas após 1927. Estudos recentes evidenciaram que a suplementação de antígenos presentes em regiões de deleção específicas, como por exemplo, a RD2, aumentam a eficácia protetora da vacina BCG em modelo animal para a tuberculose (Kalra *et al.* 2007). Além disto, diversos trabalhos têm apontado estes antígenos como possíveis candidatos diagnósticos da tuberculose (Chen *et al.* 2009). Todavia, o uso destes antígenos como método diagnóstico em países, como o Brasil, que utilizam cepas vacinais distribuídas antes de 1927 (figura 1.3), não resultaria em uma resposta específica uma vez que estas cepas são capazes de expressar estas proteínas (Geisbrecht *et al.*, 2006).

A proteína Cfp21 também foi descrita como um antígeno capaz de induzir a proliferação de células T, altos níveis de IFN $\gamma$  e IL12, além de suscitar uma atividade citotóxica das células T e uma forte resposta humoral representada pelos elevados

níveis de IgG1 e IgG2a (Grover *et al.* 2006). Diversos trabalhos têm confirmado que a Mpt64 é capaz também de elicitar uma reação DTH e elevar os níveis de IFN $\gamma$  em pacientes e seus contatos (Roche *et al.*, 1996; Elhay *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1998).

Apesar destas proteínas serem alvos de diagnóstico para TB e candidatos vacinais, não há relatos na literatura sobre a utilização destes antígenos como possíveis correlatos de proteção induzida pela vacinação, uma vez que a maior parte destes trabalhos são realizados com BCGs que não apresentam a região RD2. Johnson e colaboradores (1999) observaram que estudantes de medicina antes e após a vacinação com BCG Connaught, quando estimulados com Mpt64, não apresentaram resposta ao IFN $\gamma$ .

Portanto, estudos que visem a identificação de biomarcadores de proteção ou diagnóstico devem considerar a cepa vacinal administrada, o agente etiológico predominante e a genética da população estudada, buscando detectar um marcador específico e sensível para uma determinada população

#### **5.4.5 Glutamina Sintetase 1 (GlnA1, rv2220)**

A proteína glutamina sintetase, (*spots* 17 [FC] e 28 [SF]) foi a única reconhecida especificamente pelos indivíduos classificados como baixos produtores de IFN $\gamma$ , em ambas as frações de estudo.

A GlnA1 é um dodecâmero de subunidades idênticas de 53 kDa, que desempenha um papel central no metabolismo do nitrogênio, e catalisa a síntese de L-glutamina a partir de L-glutamato, amônia e ATP. Harth, Clemens e Horwitz, (1994) identificaram a GlnA1 como um componente importante do filtrado de cultura de *M. tuberculosis*, e propuseram algumas funções: provável alteração do nível de amônia (e pH) no fagossoma da célula hospedeira, possivelmente auxiliando o bacilo na prevenção da fusão fago-lisossomo, envolvimento na síntese de poli-L-glutamato-glutamina presente na parede celular de micobactérias patogênicas, e ausente nas não patogênicas. Embora não possua um peptídeo líder, sua presença no meio extracelular provavelmente reflete um elevado nível de expressão, abundância no ambiente intracelular, estabilidade extracelular, ou pode ser resultado da autólise bacteriana (Tullius, Harth e. Horwitz, 2001).

Esta proteína já tem sido estudada como um novo alvo de ação de antibióticos (Harth e Horwitz, 2003). Há relato na literatura de sua habilidade em induzir resposta CD8<sup>+</sup> - citotóxica em humanos, observada pelo estímulo de PBMC de pacientes tuberculosos e indivíduos saudáveis PPD positivos (Dong *et al.*, 2004). Um mutante auxotrófico de *M. tuberculosis*, produzido após deleção do gene *glnA1*, foi capaz de conferir proteção similar a vacinação com BCG em modelo murino (Lee *et al.*, 2006).

## 5.5 Clonagem e expressão das proteínas de interesse

A aplicabilidade e validação das proteínas selecionadas em nosso estudo (Mpt64, Mpt70, Mpt83, Apa e GlnA1), como potenciais correlatos de proteção, está sendo avaliada através do estudo da imunoreatividade de suas formas recombinantes. Para uma avaliação preliminar, empregamos uma abordagem rápida para a clonagem e expressão dos genes micobacterianos de interesse possibilitando sua produção em *Escherichia coli* (exceto a proteína Apa gentilmente cedida pela Dra Cynthia Horn IPEC-Fiocruz).

Os genes de interesse foram expressos em fusão C-terminal com 6His, uma seqüência de seis resíduos consecutivos de histidina, comumente utilizada para purificação de proteínas recombinantes, e fusão N-terminal com a proteína tioredoxina (Trx), expressa por *E. coli* em altos níveis, a fim de favorecer a taxa de expressão dos genes de interesse e a solubilidade das proteínas recombinantes.

Ao empregarmos o sistema de expressão pBAD Thio TOPO fusion (Invitrogen) obtivemos com sucesso a clonagem de todos os genes selecionados e expressão das proteínas desejadas, na fração insolúvel (corpos de inclusão).

A formação de corpos de inclusão (agregado protéico insolúvel) não traz, necessariamente, desvantagens ao processo, pois, o produto expresso tende a ser menos tóxico para a célula hospedeira, estando protegido da digestão proteolítica. Outro ponto positivo é o fato de serem facilmente isolados por centrifugação e, geralmente, consistirem em agregados parcialmente puros da proteína super-expressa (Sambrook e Russel, 2001).

Classicamente, a purificação de proteínas, juntamente com a expressão protéica, têm se constituído nos maiores desafios na tecnologia do DNA recombinante (Sambrook e Russel, 2001). No presente trabalho, a purificação de proteínas não foi fator limitante no rendimento final do processo, pois todas as

quatro proteínas expressas foram purificadas com êxito. A metodologia empregada, afinidade a metal imobilizado (Ni-NTA) em esferas magnéticas de agarose, apresentou êxito na obtenção de eluídos com alto teor protéico. A eluição das proteínas recombinantes foi realizada empregando-se apenas a abordagem por decréscimo de pH.

Os resultados da avaliação da resposta humoral individual dos soros contidos nos *pools* empregados nos ensaios 2DE-WB, frente às formas recombinantes, até o momento, mostraram que a diluição 1: 40.000 reproduziu o resultado obtido no 2DE-WB, ou seja, o reconhecimento das proteínas Mpt70 e Mpt83 apenas pelo indivíduo com alto nível de IFN $\gamma$  e da proteína GlnA1 para o indivíduo com baixo nível desta citocina.

A existência ou não de relação entre ambas as respostas imunes, humoral e celular (caracterizada pelo nível de produção de IFN $\gamma$ ), só poderá ser confirmada com estudos adicionais como dosagem de IgG e tipagem das mesmas, a fim de verificar se há correlação entre o nível de produção de IFN $\gamma$  apresentado pelos indivíduos, e a concentração e o isotipo de IgG à ele associado.

## 5.6 Reposta Imune pela BCG Moreau em indivíduos saudáveis revacinados

A imunidade protetora anti-micobacteriana é essencialmente mediada pela resposta imune celular. Entretanto, a contribuição da imunidade humoral para a proteção contra a infecção pelo patógeno ou desenvolvimento da doença ainda é muito debatida, mas tem sido sugerido que anticorpos específicos contra epítomos de superfície e com o isotipo correto podem conferir proteção contra infecções por patógenos intracelulares (revisado por Doherty e Andersen, 2005). Curiosamente, camundongos deficientes em células B são mais suscetíveis à tuberculose (Abebe e Bjune, 2009).

A revacinação de estudantes das áreas de saúde com *M bovis* BCG Moreau foi capaz de suscitar ambas os tipos de resposta imune, celular e humoral. A observação de que indivíduos classificados como alto produtores de IFN $\gamma$  apresentaram anticorpos para as principais proteínas imunogênicas extracelulares do BCG Moreau, sugere que possivelmente estes indivíduos estejam melhor protegidos contra a tuberculose que os demais, a despeito de terem sido revacinados também.

O estudo de Oliveira (2009) avaliou a produção de citocinas frente ao estímulo com antígenos micobacterianos através do sangue total dos mesmos indivíduos incluídos em nosso trabalho (PPD negativos revacinados na idade adulta). O resultado demonstrou que a produção de IFN $\gamma$  em resposta ao estímulo por antígenos micobacterianos (lisado de *M. tuberculosis* H37Rv) atingiu o pico máximo 2 meses após revacinação. Alguns indivíduos, apesar de terem sido considerados saudáveis, respondem fracamente à vacinação apresentando produção de baixos níveis de IFN $\gamma$ . Imunologicamente, estes dados corroboram com os reportados por Barbosa e colaboradores (2003) e Nabeshima e colaboradores (2005).

Ao avaliarmos a resposta humoral destes indivíduos através do imunoproteoma das proteínas extracelulares de *M. bovis* BCG Moreau, observamos o mesmo tempo (2 meses), da indução da resposta celular, para o desenvolvimento de anticorpos contra as principais proteínas imunogênicas do *M. bovis* BCG Moreau (Mpt63, Mpt64, Mpt70, Mpt83 e Cfp21), nos indivíduos com elevados níveis de IFN $\gamma$ . Os baixos produtores desta citocina não apresentaram anticorpos contra tais proteínas.

Embora o envolvimento de células T<sub>H1</sub> na imunidade protetora contra a tuberculose já tenha sido demonstrado, o papel do IFN $\gamma$  como correlato de proteção contra tuberculose ainda é controverso. Um recente estudo demonstrou que células T - micobactéria específicas obtidas de indivíduos após vacinação com BCG, inibiram o crescimento do BCG em um sistema *ex vivo* (Worku e Hoft, 2003), sugerindo que as células T<sub>H1</sub> de memória desenvolvidas após a vacinação com BCG podem contribuir para a prevenção da tuberculose *in vivo*. Outros estudos *ex vivo* são necessários para investigar se células T<sub>H1</sub> *M. tuberculosis*-específicas desenvolvidas após a vacinação com BCG são capazes de inibir o crescimento de *M. tuberculosis* virulento.

A hiporesponsividade ao *M. tuberculosis*, conhecida como anergia, está relacionada a fatores ambientais e genéticos. Já foi relatado que em países tropicais, como o Brasil, a exposição prévia a micobactérias ambientais, pode inibir a reação ao PPD após a vacinação com BCG (McMurray *et al.*, 1996). Vários fatores biológicos também podem contribuir para a anergia, como a IL-10 (Boussiotis *et al.*, 2000), TGF- $\beta$  (Toossi *et al.*, 1995), óxido nítrico (Nabeshima *et al.*, 1999), e fatores genéticos (Wilkinson *et al.*, 2000, Altare *et al.*, 2001, Stein *et al.*, 2003). Acreditamos



que os indivíduos estudados com baixos níveis de IFN $\gamma$  após a revacinação com BCG tenham maior risco de desenvolver a tuberculose, porque não foram capazes de produzir IFN $\gamma$  em níveis satisfatórios em resposta ao lisado de *M. tuberculosis*. Infelizmente o acompanhamento destes indivíduos a longo prazo não faz parte do escopo do projeto desenvolvido pelo grupo. Um melhor conhecimento a respeito dos mecanismos de que levam à ausência de resposta após a vacinação com BCG será necessário para o desenvolvimento de uma nova vacina ou o aprimoramento da existente.

As respostas imunes são geradas por diferentes *backgrounds* genéticos. Assim, deficiência em certas citocinas como IL-12 e IFN $\gamma$  e seus receptores podem levar a um aumento da susceptibilidade a doença micobacteriana (Dorman e Holland, 2000).

Os dados obtidos até o momento nos levam a considerar que a revacinação de profissionais da área de saúde PPD negativos com BCG Moreau pode levar a uma proteção efetiva. Todavia, estudos adicionais precisam ser efetuados para a confirmação destas proteínas como potenciais correlatos de proteção oferecida pela cepa vacinal brasileira. Este é o primeiro relato que detalha o perfil de reconhecimento sorológico por indivíduos revacinados com BCG Moreau frente a antígenos extracelulares da cepa homóloga, e contribui para uma melhor compreensão da cepa vacinal brasileira contra a TB.

## 6 Conclusões

- ✓ A focalização isoelétrica preparativa e a tecnologia imunoproteômica constituíram abordagens favoráveis para os ensaios 2DE-WB com as proteínas extracelulares de *M. bovis* BCG Moreau, separando-as conforme ponto isoelétrico e massa molecular, reduzindo substancialmente o *background* e elevando a concentração de proteínas com pls na faixa de pH de interesse (pH 4 -7);
- ✓ Os perfis de reconhecimentos humorais obtidos para os diferentes grupos de indivíduos estudados foram claramente distintos, apesar do reconhecimento comum dos antígenos membros do complexo Ag85 por todos os grupos avaliados;
- ✓ O perfil diferencial da resposta humoral acompanhou a diferença observada na resposta celular, caracterizada pela produção de IFN $\gamma$ . Somente os indivíduos revacinados com BCG Moreau, com elevada produção desta citocina, apresentaram anticorpos para as principais proteínas imunogênicas extracelulares da cepa vacinal – Apa, Cfp21, Mpt63, Mpt64, Mpt70 e Mpt83. A proteína GlnA1 foi reconhecida apenas pelos indivíduos revacinados com baixos níveis de IFN $\gamma$ . Nenhuma destas proteínas mostrou reatividade cruzada com os indivíduos controle não revacinados;
- ✓ O sistema de clonagem e expressão escolhido revelou-se eficiente para a obtenção das formas recombinantes das proteínas selecionadas (GlnA1, Mpt64, Mpt70 e Mpt83), nos permitindo uma avaliação preliminar da aplicabilidade das mesmas como possíveis biomarcadores de proteção frente aos soros individualizados contidos nos *pools* antes e pós revacinação;
- ✓ Os ensaios de *Western blot* com as formas recombinantes revelaram que, principalmente as proteínas Mpt70 e Mpt83, podem constituir potenciais correlatos da proteção conferida pela vacinação com BCG Moreau, por terem sido imunogênicas apenas para indivíduos com elevado nível de IFN $\gamma$ ;
- ✓ O ensaio de *Western blot* para a determinação do título ideal dos soros individuais para avaliar a imunoreatividade das formas recombinantes das proteínas selecionadas revelou que a melhor diluição foi de 1:40.000, mostrando um resultado compatível com o imunoblot;

- ✓ Estudos adicionais a respeito da modulação da resposta imune pela cepa vacinal BCG Moreau na população brasileira são necessários para a determinação de sua resposta imune protetora, e de um potencial correlato da proteção por ela conferida, levando em consideração a genética populacional e o agente etiológico predominante;
  
- ✓ Este é o primeiro relato que detalha o perfil de reconhecimento sorológico de indivíduos revacinados com BCG Moreau, frente a antígenos extracelulares da cepa homóloga, e contribui para uma melhor compreensão da cepa vacinal brasileira contra a tuberculose.

## 7 Referências Bibliográficas

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;

Abebe F, Bjune G. The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Experimental Immunology* 2009; 157:235-243;

Alexander DC, Behr MA. Rv1773 is a transcriptional repressor deleted from BCG-Pasteur. *Tuberculosis* 2007 Sep;87(5):421-5;

Altare F, Ensser A, Breiman A, Reichenbach J, Baghdadi JE, Fischer A, et al. Interleukin-12 receptor beta-1 deficiency in a patient with abdominal tuberculosis. *J Infect Dis* 2001; 184:231-6;

Andersen P. The cell response to secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology* 1994; 191: 537-547;

Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000; 356:1099-104;

Agger EM, Andersen P. A novel TB vaccine: towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Vaccine* 2002; 21:7-14;

Ariel N, Zvi A, Makarava KS, Chitlaru T, Elhanany E, Velan B, et al. Genome-based bioinformatic selection of chromosomal bacillus anthracisputative vaccine candidates coupled with proteomic identification of surface-associated antigens. *Infect Immunity* 2003; 71:4563-4579;

Britton WJ, Palendira U. Improving vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 2003; 81:34-45;

Barbosa T, Arruda S, Fernandes BD, Carvalho LP, Cardoso S, Cunha S, et al. BCG (Bacille of Calmette–Guerin) revaccination leads to improved in vitro IFN-gamma

response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian schoolage children. *Vaccine* 2003; 21:2152-60.

Barnes PF. Diagnosing latent tuberculosis infection: turning glitter to gold. *Am J Respir Crit Care Med*; 2004; 170:5-6.

Barry III, CE, Mdluli, K. Drug sensitivity and environmental adaptation of mycobacterial cell wall components. *Trends Microbiol.*; 1996; 4, 275–281.

Bashyam MD, Hasnain SE. The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. *Infect Genet Evol* 2004; 4: 301-308;

Benévolo-de-Andrade TC, Monteiro-Maia R, Cosgrove C, Castello-Branco LRR. BCG Moreau Rio de Janeiro - An oral vaccine against tuberculosis – Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 Aug; 100(5): 459-465;

Billman-Jacobe H, Radford AJ, Rothel JS, Wood PR. Mapping of the T and B cell epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein, MPB70. *Immunol Cell Biol* 1990; 68:359-65;

Biomarker Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clini Pharmacol Ther* 2001; 69, 89-95;

Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999; 284:1520-3;

Behr MA, Schroeder BG, Brinkman JN, Slayden RA, Barry CE. A point mutation in the *mma3* gene is responsible for impaired methoxymycolic acid production in *Mycobacterium bovis* BCG strains obtained after 1927. *J Bacteriol* 2000; 182:3394-9;  
Behr MA, Sherman DR. Mycobacterial virulence and specialized secretion: same story, different ending. *Nat Med* 2007; 13:286-7;

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(5317):1420-2;

Beran V, Havelkova M, Kaustova J, Dvorska L, Pavlik I. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinarni Medicina* 2006; 51(7):365-389;

Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 1998; 144:3195–3203;

Bonah C. The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof and standards, 1921–1933. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci* ;2005; 36:696-721;

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;

Bothamley G H, Rudd R, Festenstein F, Ivanyi J. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Thorax*. 1992; 47:270-275;

Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, et al. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 2000; 105:1317–25;

Boyton RJ, Openshaw PJ. Pulmonary defence to acute respiratory infections. *Br Med Bull* 2002; 61:1–12;

Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev Biochem* 1995; 64:29-63;

Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2003; 83: 91-97;

Brewer TF. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis* 2000; 31:64-7;

Britton WJ e Palendira U. Improving vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 2003; 81:34-45;

Brooks JV, Frank AA, Keen MA, Bellisle JT, Orme IM. Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect Immun* 2001; 69:2714–7;

Brown RM, Cruz O, Brennan M, et al. Lipoarabinomannan-reactive human secretory immunoglobulin response induced by mucosal bacilli Calmette–Guerin vaccination. *J Infect Dis* 2003; 187:513-7;

Brosch R, Gordon SV, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Soravito C, Barrel BG, Cole ST. Use of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect Immun* 1998; 66:2221–2229;

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, Van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:3684-3689;

Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:5596-601;

Buddle BM, Wedlock DN, Parlane NA, Corner LA, De Lisle GW, Skinner MA. Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. *Infect Immun* 2003; 71(11):6411-9;

Buttiaux, R., Beerens, H. & Tacquet, A. 1966. Mycobactéries. In Manuel de Techniques Bactériologiques, 2nd edn, pp. 477-547. Edited by R. Buttiaux, H. Beerens & A. Tacquet. Paris: Flammarion;

Caiaffa WT, Graham NM, Galai N, Rizzo RT, Nelson KE, Vlahov D.. Instability of delayed-type hypersensitivity skin test anergy in human immunodeficiency virus infection. Arch Intern Med 1995; 23: 2111-2117;

Calle JM, Nardin EH, Clavijo P, Boudin C, Stuber D, Takacs B, Nussenzweig RS, Cochrane AH. Recognition of different domains of the *Plasmodium falciparum* CS protein by the sera of naturally infected individuals compared with those of sporozoite-immunized volunteers. J Immunol. 1992; 149:2695-2701;

Chambers MA, Gavier-Widen D, Hewinson RG. Antibody bound to the surface antigen MPB83 of *Mycobacterium bovis* enhances survival against high dose and low dose challenge. FEMS Immuno Med Microbiol 2004; 41:93–100;

Chan J, Kaufmann SHE. Pathogenesis, Protection and Control. In Tuberculosis, ed. BR Bloom, 1994; 271–284. Edited by Am Soc Microbiol, Washington DC;

Charlet D, Mostowy S, Alexander D, et al. Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in sigK. Mol Microbiol 2005; 56:1302-13;

Chen J, Su X, Zhang Y, Wang S, Shao L, Wu J, Wang F, Zhang S, Wang J, Weng X, Wang H, Zhang W. Novel recombinant RD2- and RD11-encoded *Mycobacterium tuberculosis* antigens are potential candidates for diagnosis of tuberculosis infections in BCG-vaccinated individuals. Microbes Infect. 2009 Sep;11(10-11):876-85. Epub 2009 May 23;

Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. JAMA 1994; 271:698-702;



Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, et al. 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;

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry III CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393:537-544;

Cole BC, Mu HH, Pennock ND, Hasebe A, Chan FV, Washburn LR. Isolation and partial purification of macrophage- and dendritic cell-activating components from *Mycoplasma arthritidis*: association with organism virulence and involvement with Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2005 Sep; 73(9):6039-47;

Cordwell SJ. Technologies for bacterial surface proteomics. *Curr Opin Microbiol* 2006 Jun; 9(3):320-9;

Cosgrove CA, Castello-Branco LRR, Hussell T, Sexton A, Giemza R, Phillips R, Williams A, Griffin GE, Dougan G, Lewis DJM. Boosting of Cellular Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* and Modulation of Skin Cytokine Responses in Healthy Human Volunteers by *Mycobacterium bovis* BCG Substrain Moreau Rio de Janeiro Oral Vaccine, *Infection and Immunity* 2006 Apr; 2449–2452;

Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* 2001; 11(9):107R-118R;

Da Fonseca, CA, Jesuino RSA, Felipe MSS, Cunha DA, Brito WA, Soares CMA. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 2001; 3:535-542;

Dall'Stella R, Krieger MA, Burger M, Agottani JB, Chahad-Ehlers S, Thomaz-Soccol V. Development of bioprocess for the production of purified protein derivative with Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis use. *J Biotechnol*. 2007 Jan 1;127(2):278-87. Epub 2006 Jul 16.

Dalton DK, Haynes L, Chu CQ, Swain SL, Wittmer S. Interferongamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med* 2000; 192:117-22;

Danese PN, Silhavy TJ. Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 1998; 32:59-94;

Derrick SC, Perera LP, Dheenadhayalan V, Yang A, Kolibab K, Morris SL. The safety of post-exposure vaccination of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 2008 Nov; 26(48):6092-8;

De Valliere S, Abate G, Blazevic A, *et al*. Enhancement of cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect Immun* 2005; 73:6711-20;

Dilks K, Rose RW, Hartmann E, e Pohlschröder M Prokaryotic Utilization of the Twin-Arginine Translocation Pathway: a Genomic Survey. *Journal of Bacteriology*, February 2003, Vol. 185, No. 4, 1478-1483;

Dobos KM, Swiderek K, Khoo KH, Brennan PJ, Belisle JT. Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63(8):2846-53;

Doherty TM, Andersen P. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clin Microbiol* 2005; 18:687-702;

Dong Y, Demaria S, Sun X, Santori FR, Jesdale BM, De Groot AS, Rom WN, Bushkin Y. HLA-A2-Restricted CD8<sub>+</sub>-Cytotoxic-T-Cell Responses to Novel Epitopes in *Mycobacterium tuberculosis* Superoxide Dismutase, Alanine Dehydrogenase, and Glutamine Synthetase. *Infection and Immunity* 2004; 72(4):2412–2415;

Dorman SE, Holland SM. Interferon- $\gamma$  and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2000 Dec; 11(4):321-333;

Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA*. 1999 Aug 18;282(7):677-86.

Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet* 2006; 367:938–940;

Elhay MJ, Oettinger T, Andersen P.. Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. *Infect Immun* 1998; 66: 3454-3456;

Espinal MA. The global situation of MDR-TB. In *Tuberculosis* ed Edinburgh, 2003; 83:44-51;

Espitia C, Espinosa R, Saavedra R, Mancilla R, Romain F, Laqueyrie A, Moreno C. Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50- to 55-kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45- to 47-kilodalton antigens. *Infect Immun* 1995; 63:580-584;

Falisse-Poirrier N, Ruelle V, ElMoualij B, Zorzi D, Pierard O, Heinen E, De Pauw E, Zorzi W. Advances in immunoproteomics for serological characterization of microbial antigens. *Journal of Microbiological Methods* 2006; (67) 593-596;

Fine PEM. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995; 346: 1339–45;

Fine PEM, Carneiro IAM, Milstien JB, Clements CJ. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes. WHO:V&B:99.23 1999: 1–42;

Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997 Jun; 61(2):136-69;

Fletcher HA. Correlates of Immune Protection from Tuberculosis *Current Molecular Medicine* 2007; 7:319-325 319

Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Ver Immunol* 2001; 19: 93-129;

Flynn JL. Lessons from experimental *M. tuberculosis* infections. *Microbes Infect*, 2006; 8:1179-88;

Franco C, Zanetta DMT. Assessing occupational exposure as risk for tuberculous infection at a teaching hospital in São Paulo, Brazil. *Int J Tuberc lung Dis* 2006; 10(4):384-389;

Geisbrecht BV, Nikonenko B, Samala R, Nakamura R, Nacy CA, Sacksteder KA. Design and optimization of a recombinant system for large-scale production of the MPT64 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expression and Purification* 2006; 46: 64-72;

Gerhardt GF, Teixeira GM, de Lima MAR, Cunha IH, de Macedo EA, Nunes AP. Estudo comparativo de respostas de duas vacinas BCG em crianças de zero a dois meses. *Bol CNCT* 1988; 2:5-13;

Gordon SV, Bottai D, Simeone R, Stinear TP, Brosch R. Pathogenicity in the tubercule bacillus: molecular and evolutionary determinants. *Bioessay* 2009; 31:378-388;

Grover A, Ahmed MF, Verma I, Sharma P, Khuller GK. Expression and purification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex-restricted antigen CFP21 to study its

immunoprophylactic potential in mouse model. *Protein Expr Purif.* 2006 Aug;48(2):274-80. Epub 2006 Mar 30.

Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2004 Jan; 51(2):359-70;

Gupta M, Subramanian V, Yadav J. Immunoproteomic Identification of Secretory and Subcellular Protein Antigens and Functional Evaluation of the Secretome Fraction of *Mycobacterium immunogenum*, a Newly Recognized Species of the *M. chelonae-M. abscessus* Group. *Journal of Proteome Research*, 2009; 8(5):2319-30;

Harboe M, Wiker HG, Lachmann PJ. Carrier effect of concanavalin- A-reactive and concanavalin-A-non-reactive material in tuberculin- PPD. *Scand J Immunol* 1990; 32:263-71;

Harboe M, Wiker HG, Ulvund G, Lund-Pedersen B, Andersen AB, Hewinson RG, Nagai S.. MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial cells. *Infect Immun* 1998; 66:289-296;

Harth G, Clemens DL, Horwitz MA. Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9342–9346;

Harth G, Horwitz MA. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Glutamine Synthetase as a Novel Antibiotic Strategy against Tuberculosis: Demonstration of Efficacy *In vivo*. *Infection and Immunity* 2003 Jan; 71(1):456-464;

Hass G, Karaali G, Ebermayer K, Metzger WG, Lamer S, Zimny-Arndt U, Diescher S, Goebel UB, Vogt K, Roznowski AB, Wiedenmann BJ, Meyer TF, Aebischer T, Jungblut PR. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics* 2002 Mar; 2(3):313-24;

Hayashi D, Takii T, Fujiwara N, Fujita Y, Yano I, Yamamoto S, Kondo M, Yasuda E, Inagaki E, Kanai K, Fujiwara A, Kawarazaki A, Chiba T, Onozaki K. Comparable

studies of immunostimulating activities *in vitro* among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) substrains. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 56 116-128;

Hewinson RG, Michell SL, Russell WP, McAdam RA, Jacobs WR Jr. Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. Scand J Immunol 1996; 43:490-9;

Hoft DF. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. Lancet 2008 Jul; 372(9633):164-75;

Hoft DF, Worku S, Kampmann B, Whalen CC, Ellner JJ, Hirsch CS *et al.*, Investigation of the relationships between immune-mediated inhibition of mycobacterial growth and other potential surrogate markers of protective *Mycobacterium tuberculosis* immunity. J Infect Dis 2002; 186(10):1448-57;

Horn, C., A. Namane, P. Pescher, M. Riviere, F. Romain, G. Puzo, O. Barzu, and G. Marchal. Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern. J. Biol. Chem. 1999; 274:32023–32030;

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, e Murphy KM. Development of Th1 CD41 T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science 1993; 260, 547–549;

Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. Proc Natl Acad Sci USA; 2003 Oct; 100(21):12420-5;

Huebner RE, Schein MF, Hall CA, Barnes SA. Delayed-type hypersensitivity anergy in human immunodeficiency virus-infected persons screened for infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Infect Dis 1994; 19: 26-32;

Jacobsen M, Mattow J, Repsilber D, Kaufmann SHE. Novel strategies to identify biomarkers in tuberculosis. *Biol Chem* 2008; 389: 487-495;

Jarlier V, Nikaido H, Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 123:11-18;

Jereb J, Klevens M, Privett T D, et al. Tuberculosis in health care workers at a hospital with an outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Intern Med* 1995; 155: 854-859;

Johnson PDR, Stuart RL, Grayson ML, Olden D, Clancy A, Ravn P, Andersen P, Britton WJ, Rothe JS. Tuberculin-Purified Protein Derivative-, MPT-64-, and ESAT-6-stimulated gamma interferon responses in medical students before and after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and in patients with tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:934–937;

Kalra M, Grover A, Mehta N, Singh J, Kaur J, Sable SB, Behera D, Sharma P, Verma I, Khuller GK. Supplementation with RD antigens enhances the protective efficacy of BCG in tuberculous mice. *Clin Immunol*. 2007 Nov;125(2):173-83. Epub 2007 Sep 4.

Khanolkar-Young S, Kolk AH, Andersen AB, Bennedsen J, Brennan PJ, Rivoire B, Kuijper S, McAdam KP, Abe C, Batra HV, et al. Results of the third immunology of leprosy/immunology of tuberculosis antimycobacterial monoclonal antibody workshop. *Infect Immun* 1992; 60:3925-3927;

Kaufmann, SHE. 1999. In *Fundamental immunology* 4th ed (Ed. Paul W.) 1335-1371 (lippincott-Raven, New York, 1999);

Kaufmann SH, Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 2000; 6:955-960;

Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology* 2001; 1: 20-30;

Kawajiri K. Isolation of MPB63 in the culture fluid of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo: genetical and immunological characterization. *Kekkaku* 2003; 78:69-78;

Klade CS. Proteomics approaches towards antigen discovery and vaccine development. *Curr Opin Mol Ther* 2002; 4:216–223;

Kumar P, Amara RR, Challu VK, Chadda VK, Satchidanandam V. The Apa protein of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates gamma interferon-secreting CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from purified protein derivative- positive individuals and affords protection in a guinea pig model. *Infect Immun* 2003; 71:1929-1937;

Kyaw MH, Clarke S, Edwards GF, Jones IG, Campbell H. Serotypes/groups distribution and antimicrobial resistance of invasive pneumococcal isolates: implications for vaccine strategies. *Epidemiol Infect* 2000; 125:561-572;

Laal S, Humoral response to *M. tuberculosis*, p.335-342. In W.R. Rom and S Garay(ed), *Tuberculosis*. 1994. Little, Brown and Co., Boston, Mas;

Laal S, Samanich KM, Sonnenberg MG, Belisle JT, O'Leary J, Simberkoff MS, Zolla-Pazner S. Surrate marker of preclinical tuberculosis in human immunodeficiency virus infection: antibodies to an 88-kDa secreted antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infectious Diseases* 1997; 176:133-143;

Laal S, Samanich KM, Sonnenberg MG, Zolla-Pazner S, Phadtare JM, Belisle JT. Human humoral responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: immunodominance of high molecular weight antigens. *Clin Diag Lab Immunol* 1997; 4: 49-56;

Laal S, Sharma YD, Prasad HK, Murtaza A, Singh S, Tangri S, Misra RS, Nath I. Recombinant fusion protein identified by lepomatous sera mimics native *Mycobacterium leprae* in T-cell responses across the leprosy spectrum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:1054-1058;



Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug; 227(5259):680-5;

Lalvani A. Spotting latent infection: the path to better tuberculosis control. *Thorax* 2003; 58: 916-18;

Lambert PA, Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2002; 46S–54S;

Laqueyrie A, Militzer P, Romain F, Eiglmeier K, Cole S, Marchal G. Cloning, sequencing and expression of the *apa* gene coding for the *M tuberculosis* 45/47 kilodalton secreted Ag complex. *Infect Immun* 1995; 4003–4010;

Lee S, Jeon B-Y, Bardarov SMC, Morris SL, Jacobs Jr WR, 2006. Protection Elicited by Two Glutamine Auxotrophs of *Mycobacterium tuberculosis* and *In Vivo* Growth Phenotypes of the Four Unique Glutamine Synthetase Mutants in a Murine Model. *Infection and Immunity* 2006 Nov; 74(11): 6491–6495;

Lee JS, Krause R, Schreiber J, Mollenkopf HJ, Kowall J, Stein R, et al. Mutation in the transcriptional regulator PhoP contributes to avirulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain. *Cell Host Microbe* 2008; 3:97-103;

Leung AS, Tran V, Wu Z, Yu X, Alexander DC, Gao GF, Zhu B, Liu J. Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. *BMC Genomics* 2008; 9:413;

Lightbody KA, McNair J, Neill SD, Pollock JM. IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunised and in tuberculin skin test-reactor cattle. *Vet Microbiol* 2000; 75:177-88;

Lin YG, Zhang M, Hofman FM, Gong JP, Barnes PF. Absence of prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infection and Immunity* 1996; 64:1351-1356;

Ling E, Feldman G, Portnoi M, Dagan R, Overweg K, Mulholland F, Chalifa-Caspi V, Wells J, Mizrahi-Nebenzahl Y. Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse. *Clin Exp Immunol* 2004;138:290–8;

Liska AJ, Schevchenko A, Expanding the organismal scope of proteomics: cross-species protein identification by mass spectrometry and its implications. *Proteomics* 2003; 3:19-28;

Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines* 2009; 5:(2)70-78;

Lounatmaa K, E Brander. Immunoelectron microscopic localization of 22 kDa protein antigen in the surface layer of *Mycobacterium bovis* BCG strains, 1990; 894–895. *In* Proceedings of the XIIth International Congress for Electron Microscopy. San Francisco Press, Inc., San Francisco, California;

Lowrie DB, Tascon RE, Silva CL. Vaccination against tuberculosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995; 108:309-12;

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 Nov; 193(1):265-75;

Lyashchenko KP, Pollock JM, Colangeli R, Gennaro ML. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun* 1998; 66: 5344–9;

Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996 Mar; 178(5):1274-82;

Malen H, Søfteland T, Wiker HG. Antigen analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv culture filtrate proteins. *Scand J Immunol* 2007; 67:245-52;

Mawa PA, Pickering JM, Miro G, Namujju PB, Watera C, Anyaegani G, Whitworth JA, Elliott AM. The effect of tuberculin skin testing on viral load and antimycobacterial immune responses in HIV-1-infected Ugandan adults. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8:586-92;

McMurray DN, Collins FM, Dannenberg AM Jr, Smith DW. Pathogenesis of experimental tuberculosis in animal models. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 215:157-79;

Milstien JB, Gibson JJ. Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. *Bull World Health Organ* 1990; 68:93-108;

Ministério da Saúde, Brasil, Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. Cadernos de Atenção Básica. Manual Técnico para o Controle da Tuberculose. Versão Preliminar. 6.<sup>a</sup> edição, Identidade Visual da Editora do Ministério da Saúde. 2002;

Ministério da Saúde, Brasil, Fundação Nacional de Saúde. 2º Informe técnico sobre a vacinação/revacinação BCG. Brasília: Ministério da Saúde. 1994;

Ministério da Saúde, Brasil, Fundação Nacional de Saúde, Controle da tuberculose. Uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT; 2002;

Missiakas D, Raina S. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol* 1998; 28: 1059-1066;

Mittrucker HW, Steinhoff U, Kohler A., Krauser M., Lazar D, Mex P, Miekley D e Kaufmann SHE. Poor correlation between BCG vaccination-induced T-cell responses and protection against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 2007; 104, 12434-12439.

Miura K, Nagai S, Kinomoto M, Haga S, Tokunaga T. Comparative studies with various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG on the production of an antigenic protein, MPB70. *Infect Immun* 1983 39:540-545.

Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, Tsai MM, Flynn JL, Chan J. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infection and Immunity* 2001; 69:1847-1855;

Mollenkopf HJ, Groine-Triebkorn D, Andersen P, Hess J, Kaufmann SH. Protective efficacy against tuberculosis of ESAT-6 secreted by a live *Salmonella typhimurium* vaccine carrier strain and expressed by naked DNA. *Vaccine* 2001 Jul; 19(28-29):4028-35;

Mustafa AS. Th1 Cell Reactivity and HLA-DR Binding Prediction for Promiscuous Recognition of MPT63 (Rv1926c), a Major Secreted Protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scandinavian Journal of Immunology* 2009; 69:213-222;

Mustafa AS, Amoudy HA, Wiker HG, Abal AT, Ravn P, Oftung F, Andersen P. Comparison of antigen specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J Immunol* 1998; 48:535-543;

Nabeshima S, Nomoto M, Matsuzaki G, Kishihara K, Taniguchi H, Yoshida S, Nomoto K. T-cell hyporesponsiveness induced by activated macrophages through nitric oxide production in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1999; 67:3221-6;

Nabeshima S, Yamaji MMK, Chong Y, Hayashi MNJ. Kinetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis*-specific cytokine production by PBMC in adults after BCG vaccination. *J Infect Chemother* 2005; 11:18-23;

Nagai S, Wiker H G, Harboe M, Kinomoto M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1991; 59:372-382.

Nakamura RM, Velmonte MA, Kawajiri K, Ang CF, Frias RA, Mendoza MT, Montoya JC, Honda I, Haga S, Toida I. MPB64 mycobacterial antigen: a new skin-test reagent through *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Vaccine* 1998; 23:1680-1685;

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988 Jun; 9(6):255-62;

Oftung F, Borka E, Mustafa AS *Mycobacterium tuberculosis* reactive T cell clones from naturally converted PPD-positive healthy subjects: recognition of the *M. tuberculosis* 16-kDa antigen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 20:319-325;

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; 79:243-250;

Oliveira ES. Potenciais marcadores de proteção para avaliação de estratégias vacinais contra Tuberculose. Tese de mestrado em imunologia, fevereiro 2009.

Ortalo-Magné A, Dupont MA, Lemassu A, Andersen AB, Gounon P, Daffé M. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology* 1995; 141:1609-1620;

Pagani, TD. Análise Comparativa do proteoma de superfície de cepas vacinais de *Mycobacterium bovis* BCG. Tese de mestrado Biologia Celular e Molecular; 2008.

Pal PG, Horwitz MA. Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective

immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 1992 Nov; 60(11):4781-92;

Peck RW. Driving earlier clinical attrition: IF you want to find the needle, burn down the haystack. Considerations for biomarker development. *Drug Discov Today* 2007; 12:289-294;

Pehler K, Brasky KM, Butler TM, Attanasio R. *Mycobacterium tuberculosis*-secreted protein antigens: immunogenicity in baboons. *J Clin Immunol* 2000 Jul; 20(4):306-16;

Pethe K, Alonso S, Biet F, Delogu G, Brennan MJ, Locht C, Menozzi FD. The heparin-binding hemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature* 2001; 412:190-4;

Perkins MD. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:S182-188;

Perkins MD, Kritski AL. Diagnostic testing in the control of tuberculosis. *Bull World Health Organ* 2002; 80:512-513;

Petit JF, Adam A, Weitzerbin-Falszpan J, Lederer E, Ghuysen JM. Chemical structure of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. Isolation and partial characterization of peptidoglycan. *Biochim Biophys Res Commun* 1969; 35: 478-83;

Pien HH, Fischman AJ, Thrall JH Sorensen AG. Using imaging biomarkers to accelerate drug development and clinical trials. *Drug Discov Today* 2005; 10:259-266;

Pinto R, Saunders BM, Camacho LR, Britton WJ, Gicquel B, Triccas JA. *Mycobacterium tuberculosis* defective in phthiocerol dimycocerosate translocation provides greater protective immunity against tuberculosis than the existing bacille Calmette-Guérin vaccine. *J Infect Dis*. 2004;189:105-12;

Plackett P, Ripper J, Corner LA, Small K, De Witte K, Melville L, Hides S, Wood PR, An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Aust. Vet. J.* 1989; 66:15-19;

Pym AS, Brodin P, Majlessi L, Brosch R, Demangel C, Williams A. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* 2003 May; 9(5):533-9;

Rabilloud T. Solubilization of Proteins in 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol* 1999; 112:9-19;

Rabilloud T. Proteome research Two dimensional gel electrophoresis and identification tools (Berlin: Springer) 2000.

Raja A, Ranganathan U D, Bethunaicken R. Clinical value of specific detection of immune complex-bound antibodies in pulmonary tuberculosis *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2006; 56:281-287;

Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Terán W, Watanabe K, Zhang X, Gallegos MT, Brennan R, Tobes R.. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005; Jun;69(2):326-56;

Rani SH, Lakshmi VV, Latha SG, Murthy KJR. Post-BCG vaccination check based on serum IgG to culture filtrate antigens. *Indian J Tuberc* 2005; 52:27-30;

Ritz N, Hanekom WA, Robins-Browne R, Britton WJ, Curtis N. 2008. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32:821-841;

Ritz N, Curtis N. Mapping the global use of different BCG vaccine strains. *Tuberculosis* 2009; 89:248-251;

Roach DR, Briscoe H, Saunders B, France MP, Riminton S, Britton WJ. Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J Exp Med* 2001; 193:239-246;

Roche PW, Triccas JA, Avery DT, Fifis T, Billman-Jacobe H, Britton WJ. Differential T cell responses to mycobacteria-secreted proteins distinguish vaccination with bacille Calmette-Guerin from infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1994; 170:1326-30;

Roche PW, Feng CG, Britton WJ. Human T-cell epitopes on the *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein MPT64. *Scand J Immunol* 1996; 43:(1)662-670;

Rodrigues LC, Pereira SM, Cunha SS, Genser B, Ichihara MY, de Brito SC, Hijjar MA, Dourado I, Cruz AA, Sant'Anna C, Bierrenbach AL, Barreto ML. Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC cluster-randomised Trial. *Lancet* 2005; 366:1290-5;

Romain F, Laqueyrie A, Militzer P, Pescher P, Chavarot P, Lagranderie M, Auregan G, Gheorghiu M, Marchal G. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria. *Infect Immun* 1993; 61:742-750;

Romain F, Horn C, Pescher P, Namane A, Riviere M, Puzo G, Barzu O, e Marchal G. Deglycosylation of the 45/47-Kilodalton Antigen Complex of *Mycobacterium tuberculosis* Decreases Its Capacity To Elicit In Vivo or In Vitro Cellular Immune Responses *Infection and Immunity*, Nov. 1999, (67) 11: 5567–5572;

Romano M, D'Souza S, Adnet PY, LAAL I R, Jurion F, Palfliet K, Huygen K. Priming but not boosting with plasmid DNA encoding mycolyl-transferase ag85a from *Mycobacterium tuberculosis* increases the survival time of *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated mice against low dose intravenous challenge with *M. tuberculosis* H37Rv *Vaccine* 2006; 24(16): 3353-3364;

Russell D G. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Aug; 2(8):569-77;



Sakula A. BCG: who were Calmette and Guerin? *Thorax* 1983 Nov; 38(11):806-12;

Samanich K, Belisle JT, Laal S. Homogeneity of antibody response in tuberculosis patients. *Infection and immunity* 2001; 4600-4609;

Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>a</sup> Ed. Cold Spring Harbor Press, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001;

Sartain MJ, Slayden RA, Singh KK, Laal S, Belisle JT I. Disease state differentiation and identification of tuberculosis biomarkers via native antigen array profiling. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5:2102–2113;

Schleifer KH, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 1972; 36:407-77;

Seibert FB, Munday B. The clinical composition of active principle of tuberculin XV: A precipitated purified tuberculin protein suitable for preparation of a standard tuberculin. *Am Rev Tuberc* 1932; 25: 724-737;

Shin GW, Palaksha KJ, Kim YR, Nho SW, Kim S, Heo GJ, Park SC, Jung TS. Application of immunoproteomics in developing a *Streptococcus iniae* vaccine for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 849:315–22;

Silva CL, Silva MF, Pietro RC, Lowrie DB. Protection against tuberculosis by passive transfer with T-cell clones recognizing mycobacterial heat-shock protein 65. *Immunology* 1994; 83: 341-6;

Skeiky YAW, Sadoff JC. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nature Reviews - Microbiology* 2006; 4:469-476;

Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63: 1710-17;

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. 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9869–9874;

Stanley SA, Raghavan S, Hwang WW, Cox JS. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 Oct; 100(22):13001-6;

Steel LF, Haab BB, Hanash SM. Methods of comparative proteomic profiling for disease diagnostics. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2005; 815, 275-284;

Stein CM, Guwatudde D, Nakakeeto M, Peters P, Elston RC, Tiwari HK, Mugerwa R, Whalen CC. Heritability analysis of cytokines as intermediate phenotypes of tuberculosis. *J Infect Dis* 2003; 187:1679–85;

Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1:97-105;

Tanghe A, D'Souza S, Rosseels V, Denis O, Ottenhoff T H M, Dalemans W, Wheeler C e Huygen K. Improved Immunogenicity and Protective Efficacy of a Tuberculosis DNA Vaccine Encoding Ag85 by Protein Boosting Infection and Immunity 2001; 69(5): 3041-3047;

Teitelbaum R, Glatman-Freedman A, Chen B, Robbins JB, Unanue E, Casadevall A, Bloom BR. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:15688-93;

Teixeira EG, Menzies D, Comstock GW, Cunha AJLA, Kritski AL, Soares LC, Bethlem E, Zanetti G, Ruffino-Netto A, Belo MTCT, Selig L, Castello Branco MM, Cherri D, Maia S, Marandino R, Luiz RR, Chaisson ER, Trajman A. Latent tuberculosis infection among undergraduate medical students in Rio de Janeiro State, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9(8):841-847;

Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol* 1995; 154:465-73;

Trajkovic V, Natarajan K, Sharma P. Immunomodulatory action of mycobacterial secretory proteins. *Microbes Infect* 2004; 6: 513-519;

Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13, 251–276;

Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 578-90;

Tullius MV, Harth G, e 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 *Infection And Immunity* 2001; 69(10):6348-6363;

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. *Lancet* 2006; 367:1173-80.

Verbon A. Development of a serological test for tuberculosis. Problems and potential. *Trop Geogr Med.* 1994; 46:275-279;

Vytvytska O, Nagy E, Bluggel M, Meyer HE, Kurzbauer R, Huber LA, Klade CS. Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis. *Proteomics* 2002; 2:580-90;

Vosloo W, Tippoo P, Hughes JE, Harriman N, Emms M, Beatty DW, Zappe H, Steyn LM. Characterization of a lipoprotein in *Mycobacterium bovis* (BCG) with sequence similarity to the secreted protein MPB70. *Gene* 1997; 88:123-128;

Wang BL, Xu Y, Li ZM, Xu YM, Weng XH, Wang HH. Antibody response to four secretory proteins from *Mycobacterium tuberculosis* and their complex antigen in TB patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9:1327-34;

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995; 16(7):1090-4;

Watanabe Y, Watari E, Matsunaga I, Hiromatsu K, Dascher CC, Kawashima T, Norose Y, Shimizu K, Takahashi H, Yano I, Sugita M. BCG vaccine elicits both T-cell mediated and humoral immune responses directed against mycobacterial lipid components *Vaccine* 2006; 24:5700–5707;

Weir RE, Gorak-Stolinska P, Floyd S, Lalor M K, Stenson S, Branson K, Blitz, R Ben-Smith A, Fine PEM e Dockrell H M . Persistence of the immune response induced by BCG vaccination. *BMC Infectious Diseases* 2008; 8:9;

Wessel D, Flügge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 1984 Apr; 138(1):141-3;

Wheeler PR, Ratledge C. 1994. in *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control* (ed. Bloom, B. R.) 353-385 (Am. Soc. Microbiol., Washington DC, 1994);

Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 2000; 355:618-21;

Wiker HG. MPB70 and MPB83 – Major Antigens of *Mycobacterium bovis*. Scandinavian Journal of Immunology 2009; 69:492-499;

Wiker HG, Harboe M, Nagai S. A localization index for distinction between extracellular and intracellular antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. J Gen Microbiol 1991 137:875-884;

Wiker HG, Nagai S, Hewinson RG, Russell WP, Harboe M. Heterogenous expression of the related MPB70 and MPB83 proteins distinguish various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Scand J Immunol 1996; 43:374–80;

Worku S, Hoft DF. Differential effects of control and antigenspecific T cells on intracellular mycobacterial growth. Infect Immun 2003;71:1763-73;

World Health Organization. TB, a global emergency. WHO report on the TB epidemic. Geneva; 1994;

World Health Organization. WHO Report 2003: Global Tuberculosis Control – Surveillance, planning, financing. In *WHO/CDS/TB/2003.316* Geneva: World Health Organization; 2003;

World Health Organization. - Report on Global Tuberculosis Control, 2005. Disponível em [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) Acesso em 29 de outubro de 2009;

World Health Organization. Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing: WHO report 2008. Genebra, 2008. Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2008/download\\_centre/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/download_centre/en/index.html) Acesso em: 29 outubro de 2009;

Wu YJ, Wang SY, Peng XX. Serum acute phase response (APR)-related proteome of loach to trauma. Fish Shellfish Immunol 2004; 16:381-389;

[www.uct.ac.za/depts/lsteyn/cellwall.html](http://www.uct.ac.za/depts/lsteyn/cellwall.html). Acesso em: 22 agosto de 2009.

Xiong S, Ding Q, Zhao Z, Chen W, Wang G, Liu S. A new method to improve sensitivity and resolution in matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Proteomics* 2003; 3:265-272;

Xu D, Chan WL, Leung BP *et al.* Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 1998; 188:1485–92;

Zuo X, Speicher DW. A Method for Global Analysis of Complex Proteomes Using Sample Prefractionation by Solution Isoelectrofocusing Prior to Two-Dimensional Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 2000; 284:266–278;

Zuo X, Echan L, Hembach P, Yao Tang H, Speicher KD, Santoli D, Speicher DW. Towards global analysis of mammalian proteomes using sample prefractionation prior to narrow pH range two-dimensional gels and using onedimensional gels for insoluble and large proteins *Electrophoresis* 2001; 22:1603-1615;

## Anexo 1

### Materiais utilizados neste estudo

#### Meios de Cultura para *E. coli*:

##### Meio LB (Luria-Bertani)

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

##### Meio LB/ágar

Meio LB acrescido de 1,5% (p/v) bacto-ágar (Difco).

##### Meio Sauton – Fornecido pela Fundação Ataulpho de Paiva

L-Asparagina	4g
Ácido Cítrico	2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5g
MgSO <sub>4</sub>	0,5g
Citrato Férrico Amoniacal	0,05g
Zn <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5mM
Glicerol	60mL
H <sub>2</sub> O Milli-RO	qsp 1000mL

### Tampões para DNA

#### TE 1X

Tris-HCl (pH8,0)	10 mM
EDTA (sal dissódico; pH 8,0)	1 mM

#### TBE 10X

Tris-base	108 g/L
Ácido bórico	55 g/L

EDTA	9,3 g/L
------	---------

Tampão para aplicação de amostras em gel de agarose (5X)

Azul de Bromofenol	0,25% (p/v)
Xileno Cianol FF	0,25% (p/v)
Ficoll 400	15% (p/v)

**Soluções utilizadas para eletroforese 1D e 2D:**

**Tampões para focalização isoeétrica em tiras IPG (géis bi-dimensionais)**

Tampão de Focalização Isoelétrica – IEF

Uréia	2,4 g (concentração final 8M)
Chaps 10% (p/v)	1 mL (concentração final 2%)
H2O milli Q	qsp 5 mL

Tampão de Equilíbrio (Tampão base)

Uréia	36 g
SDS 10% (p/v)	20 mL
Tris-HCL 1,5 M pH 8,8	25 mL
Glicerol 100%	20 mL
H2O milli Q	qsp 100 mL

Tampão para aplicação de proteínas em gel SDS-PAGE (1X)

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

**Gel SDS-PAGE**

<u>Gel de separação 15%</u>	<u>6 mL</u>
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	1,5 mL
Acilamida 30% / Bis-Acrlamida 0,8%	3,0 mL
SDS 10%	60 µL
APS 10%	60 µL



TEMED	6 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O Milli-Q	1,38 mL
<u>Gel de separação 12%</u>	<u>6 mL</u>
Tris-HCl 1,5M (pH8,8)	1,5mL
Acrilamida 30%/ Bis-Acrilamida 0,8%	2,4mL
SDS 10%	60 $\mu$ L
APS 10%	60 $\mu$ L
TEMED	6 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O Milli-Q	1,98mL
<u>Gel de empacotamento 4%</u>	<u>4 mL</u>
Tris-HCl 1 M (pH 6,8)	0,5 mL
Acrilamida 30% / Bis-Acrilamida 0,8%	0,67 mL
SDS 10%	40 $\mu$ L
APS 10%	40 $\mu$ L
TEMED	4 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O Milli-Q	2,7 mL

### **Agarose contendo azul de bromofenol**

0,5% agarose em tampão Laemmli 1x contendo 0,001% de azul de bromofenol.

### **Soluções de coloração para géis SDS-PAGE**

<u>Coomassie Brilliant Blue R-250</u>	
Etanol P.A	30%
Ácido acético glacial	7%
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad)	0,5%

### **Tampões para *Western Blot***

<u>Tampão para eletro-transferência de proteínas (géis SDS-PAGE)</u>	
Tris-base	25 mM
Glicina	192 mM

Tampão TBS (10X)

1M Tris-HCl, pH 7,5	100 mL
NaCl	87g
	qsp 1 L

**Purificação de Proteínas Recombinantes**Tampão de lise bacteriana:

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

Solução de lisozima

10 mg/mL em 100 mM Tris-HCl pH 8,0

Tampão Triton ( para lavagem dos corpos de inclusão):

Tris-HCl pH 8,5	50 mM
Triton X-100	0,5%
EDTA	5 mM
NaCl	150 mM

Solução desnaturante para solubilização de corpos de inclusão:

Tris-HCl pH 8,0	100 mM
Uréia	8 M
NaCl	0,3M
Imidazol	5mM

Tampão fostato pH 6,3 para lavagem das pérolas de agarose magnéticas

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
Uréia	8 M
NaCl	0,3M
Imidazol	5mM

Tampão acetato pH 4,5 para eluição das proteínas purificadas

Acetato de sódio	50 mM
------------------	-------

---

Uréia	8 M
NaCl	0,3M
Imidazol	5mM

**Soluções para tratamento dos spots protéicos para identificação por espectrometria de massas**

Solução de tripsina

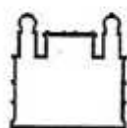
Solução estoque: 200 ng/ $\mu$ L em ácido acético 50 mM

Preparo de solução matriz:

Matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico) Concentração: 10mg/mL

Solubilizada em acetonitrila 50% / 0,3% TFA

## Anexo 2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**PARECER Nº 19/2002****Protocolo: 106****Projeto de Pesquisa: "Estabelecimento de potenciais marcadores de proteção para a avaliação de estratégias vacinais contra infecções micobacterianas"****Pesquisador Responsável: Dr. Sergio Marcos Arruda****Instituição ou Departamento: Unidade de Histopatologia/CPqGM/Fiocruz****Considerações:**

Após a análise ética do projeto, tendo sido feitos pelo responsável os esclarecimentos solicitados e pelo mesmo adequadas às pendências apontadas, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 12 de novembro de 2002

Dr. Ítalo A. Sherlock  
Coordenador do  
CEP-CPqGM/Fiocruz

**ÍTALO A. SHERLOCK**  
Coordenador do CEP-CPqGM  
Unidade de Histopatologia/CPqGM/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa - Rua Waldemar Falcão, nº 121, Brotas, Salvador, Bahia, CEP 40295-001, Brasil

Tel: (71) 356-0129 Fax: (71) 356-2155

e-mail: sherlock@cpqgm.fiocruz.br