

**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO  
IMUNOLÓGICA DO GENE *RV1419* DE *MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS***

**LUCAS DE LIMA NOGUEIRA**

**Salvador - Bahia - Brasil**

**2008**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO  
IMUNOLÓGICA DO GENE *RV1419* DE *MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS***

**LUCAS DE LIMA NOGUEIRA  
ORIENTADOR: MANOEL BARRAL-NETTO**

Dissertação apresentada para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Patologia Experimental

**Salvador-Bahia-Brasil  
2008**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Nogueira, Lucas de Lima  
N778c Clonagem, expressão e caracterização imunológica do gene *Rv1419* de  
*Mycobacterium Tuberculosis* [manuscrito] / Lucas de Lima Nogueira. - 2008.  
86 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de  
Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.  
Orientador: Prof. Manoel Barral-Netto, Laboratório Integrado de Microbiologia e  
Imunorregulação.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Tuberculose. 3. Lectinas. 4. Bioinformática.  
I.Título.

CDU 616.982.2:577.27

“CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DO GENE RV1419 DE  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*”

**LUCAS DE LIMA NOGUEIRA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



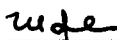
---

Dr. Benildo Sousa Cavada  
Professor  
UFC



---

Dra. Patricia Sampaio Tavares Veras  
Pesquisadora Titular  
FIOCRUZ



---

Dr. Manoel Barral-Netto  
Pesquisador Titular  
FIOCRUZ

## DEDICATÓRIA

---

À minha família, em especial à “*Vó Alice*” e “*Tia Êta*”, pelo constante apoio, carinho e amor. Às minhas queridas irmãs, *Camila* e *Livia*, pelos conselhos e por tornarem a minha vida mais alegre.

À *Tâmara Nogueira*, minha companheira e confidente, por tornar o exercício de viver mais amoroso.

## **AGRADECIMENTOS**

---

O trabalho desta dissertação foi desenvolvido em sua maioria no Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunorregulação do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ. Eu gostaria de expressar minha gratidão para as pessoas que de alguma maneira contribuíram para o trabalho. Em particular, gostaria de agradecer:

Ao meu orientador, Professor Manoel Barral-Netto, a quem devo parte da minha formação científica, pelas oportunidades oferecidas durante a minha estadia em seu laboratório, pelas reuniões constantes e pelo exemplo de pesquisador comprometido com a formação de recursos humanos no Brasil.

Aos Professores Benildo Sousa Cavada e Cristiane Frota, sem os quais não imagino minha vida acadêmica, pelo entusiasmo inabalável e cuja orientação durante a minha graduação forneceu bases sólidas para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Ao Professor Sérgio Costa Oliveira, pela colaboração fundamental para o LIMI e pelo companheirismo e gentileza em me receber em seu laboratório: Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia de Doenças Infecciosas do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foram iniciados os experimentos de expressão de proteínas com a Dra. Fernanda Caldas, cuja paciência e ensino tornaram agradável o aprendizado.

Dra. Aldina Barral, Cláudia Brodskyn, Valéria Borges, Jorge Clarêncio e Camila Indiani pelo suporte técnico-científico durante a realização deste trabalho.

Dra. Patrícia Veras, Juliana Perrone, Taís Almeida e Luana Palma do LPBI-1 pela amizade, colaboração e discussões que enriqueceram este trabalho.

Aos meus queridos amigos, Celso Nagano, Gustavo Arruda, Victor Alves, Taianá Maia e Roberta Magalhães pela amizade e companheirismo durante todo esse tempo e que, apesar da distância, ainda hoje permanecem.

Ao Pepeu, pela colaboração e ensinamentos em bioinformática no início do trabalho.

A Valmari Nogueira, Íris Nogueira, Thamires Nogueira, Lucas Pereira e Tâmara Nogueira pelos momentos de alegria e por proporcionar um ambiente familiar durante a minha estadia em Salvador.

Aos grandes amigos baianos Jorge Tolentino, André Báfica, Robson Amaro, Almério Papito, Dirceu Costa, Ricardo Khouri e Bruno Bezerril pela amizade e suporte nos momentos difíceis e por tornarem o ambiente de trabalho agradável com discussões científicas.

Aos demais colegas do LIMI-LIP: Théo, Jaqueline, Natalí, Sushi, Gil, Cecília, Natália, Ana Paula, Claire, Sarah, Fernanda, Deboraci, Tatiana, Márcia, Edvaldo, Elze e Andrezza.

A todos os colegas, professores e funcionários do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Em especial aos funcionários da biblioteca pelos serviços prestados durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

A Direção do Hospital Especializado Octávio Mangabeira pela colaboração e suporte durante as coletas de sangue de pacientes com tuberculose.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida a mim para a realização do mestrado.

# SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	10
<b>RESUMO</b>	14
<b>ABSTRACT</b>	15
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A TUBERCULOSE	16
1.2 BREVE HISTÓRICO	16
1.3 SITUAÇÃO DA TUBERCULOSE NO MUNDO	17
1.4 RESISTÊNCIA À DROGAS EM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	18
1.5 CO-INFECÇÃO COM HIV E PATOGÊNESE	20
1.6 O GÊNERO MYCOBACTERIUM	21
1.7 BIOLOGIA MOLECULAR DE MICOBACTÉRIAS	22
1.7.1 <i>O genoma de M. tuberculosis</i>	23
1.7.2 <i>O papel de alguns genes envolvidos na virulência</i>	25
1.7.3 <i>Enzimas antioxidantes</i>	25
1.7.4 <i>Genes relacionados à invasão celular</i>	26
1.7.5 <i>Lectinas</i>	26
1.8 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA	27
1.8.1 <i>Ferramentas de bioinformática</i>	28
1.8.2 <i>Anotação funcional de domínios protéicos</i>	28
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	30
<b>3 OBJETIVO GERAL</b>	30
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
<b>4 DESENHO EXPERIMENTAL</b>	31
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	32
5.1 CASUÍSTICA	32
5.1.1 <i>Pacientes</i>	32
5.2 MINERAÇÃO DE DADOS	33
5.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	34
5.4 CONSTRUÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS E AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>RV1419</i>	34
5.5 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO POR PCR	36
5.6 CLONAGEM DO FRAGMENTO PROVENIENTE DA EXTRAÇÃO DO GEL	37
5.6.1 <i>Meios de cultura</i>	37
5.6.2 <i>Transformação de células de Escherichia coli competentes</i>	37
5.6.3 <i>Avaliação da transformação</i>	38
5.7 <i>MINI-PREP</i> PARA PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS	38
5.7.1 <i>Análise de restrição</i>	38
5.8 SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL DOS CLONES OBTIDOS	39
5.9 SUBCLONAGEM PARA O VETOR DE EXPRESSÃO	39



5.10	EXPRESSÃO HETERÓLOGA-----	40
5.11	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE-----	41
5.11.1	<i>Western-blot</i> -----	41
5.12	ENSAIO DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE-----	42
5.13	ENSAIOS COM MACRÓFAGOS DA LINHAGEM J774-----	42
5.13.1	<i>Imunofluorescência</i> -----	42
5.13.2	<i>Estimulação in vitro com a re-Rv1419p</i> -----	43
5.13.3	<i>Detecção de citocinas pelo método de ELISA</i> -----	43
5.14	SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES-----	44
5.14.1	<i>Cultura de células mononucleares do sangue periférico para re-estimulação in vitro e secreção de citocinas</i> -----	45
5.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	45
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> -----	<b>47</b>
6.1	ANÁLISE BIOINFORMÁTICA.-----	47
6.2	AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM NO VETOR PMOSBLUE-----	47
6.3	ANÁLISE DE RESTRIÇÃO E SEQÜENCIAMENTO-----	49
6.4	UBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO E ANÁLISE DE RESTRIÇÃO-----	51
6.5	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA RV1419P A PARTIR DO VETOR DE EXPRESSÃO-----	52
6.6	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RE-RV1419P POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE-----	54
6.7	<i>WESTERN-BLOT</i> -----	55
6.8	ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE-----	56
6.9	IMUNOFLUORESCÊNCIA-----	57
6.10	ESTIMULAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MACRÓFAGOS J774-----	58
6.11	ESTIMULAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CMSP HUMANAS-----	62
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> -----	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> -----	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	<b>73</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

BLAST	<i>Basic Local Alignment and Search Tool</i>
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
ddNTP	di-deoxiribonucleotídeo trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	deoxiribonucleotídeo trifosfato
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
kDa	<i>Kilodaltons</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NCBI	<i>National Center For Biotechnology Information</i>
ORF	<i>Open Reading frame</i>
pb	pares de base
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
Re-Rv1419p	proteína recombinante Rv1419p
RPM	Rotações por minuto
Rv1419p	proteína codificada pelo gene Rv1419
TB	Tuberculose
TBE	Tampão Tris Borato EDTA
TE	Tampão Tris EDTA
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Taxas estimadas de incidência da tuberculose em 2004.	18
<b>Figura 2.</b>	Representação esquemática do envelope celular do <i>Mtb</i> mostrando a diversidade química de moléculas de lipídios e glicolipídios, incluindo ácidos micólicos, membrana celular, camada de peptidoglicano e moléculas de ácido micólico-arabinogalactano (Riley, 2006).	22
<b>Figura 3.</b>	Ilustração mostrando os passos utilizados para obtenção de seqüências hipotéticas do genoma de <i>M. tuberculosis</i> relacionadas às lectinas.	33
<b>Figura 4.</b>	Seqüência codificadora da ORF <i>Rv1419</i> ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Genome Project – número de acesso 38490250 no NCBI). A seqüência possui 474 nucleotídeos que codificam para a proteína hipotética <i>Rv1419p</i> . Os nucleotídeos em negrito vermelho e azul correspondem aos códons de início e de parada da tradução, respectivamente. As seqüências em negrito representam os oligonucleotídeos <i>forward</i> e <i>reverse</i> (5' e 3') utilizados como iniciadores ( <i>primers</i> ).	35
<b>Figura 5.</b>	Representação esquemática do vetor de clonagem <i>pMOSBlue</i> (GE Healthcare).	37
<b>Figura 6.</b>	Representação esquemática do vetor de expressão <i>pET-15b</i> (Novagen).	40
<b>Figura 7.</b>	Amplificação da ORF codificadora da proteína hipotética <i>Rv1419p</i> . A coluna A é o padrão de massa molecular de 250 pb DNA Ladder da Invitrogen. A coluna 1 é a ORF <i>Rv1419</i> amplificada. A coluna 2 representa o controle negativo da reação de PCR. O meio de separação foi gel de agarose 1 % em tampão 1X TBE, pH 8,0. A voltagem aplicada durante a separação foi 100 V por 40 min. Os fragmentos de DNA no gel foram visualizados em transiluminador UV.	48
<b>Figura 8.</b>	Eletroforese dos plasmídeos digeridos <i>pMOSBlue-Mtb</i> . A coluna A é o padrão de massa molecular 1kb Plus DNA Ladder da Invitrogen. As colunas 4 e 9 são os clones positivos selecionados a serem utilizados na subclonagem para o vetor de expressão. O meio de separação foi gel de agarose 1% em tampão 1X TBE, pH 8,0. A voltagem aplicada durante a separação foi 100 V por 30 min. Os fragmentos de DNA foram visualizados em transiluminador UV.	50

<b>Figura 9.</b>	Bases seqüenciadas do plasmídeo pMOSBlue-Mtb extraído dos dois clones positivos. As bases correspondem a ORF Rv1419 que codifica para proteína Rv1419p.	51
<b>Figura 10.</b>	Separação dos plasmídeos digeridos pET-15b-Mtb. A coluna A é o padrão de massa molecular DNA Ladder da Invitrogen. As colunas de 1 a 2 e de 4 a 7 são os clones positivos, sendo a coluna 3 um contaminante. O meio de separação foi gel de agarose 0,8 % em tampão 1X TBE, pH 8,0. A voltagem aplicada durante a separação foi de 100 V por 40 min. Os plasmídeos digeridos e os insertos de 500 pb foram visualizados em transiluminador UV.	52
<b>Figura 11.</b>	Expressão da proteína Rv1419p. A análise foi realizada em SDS-PAGE a 12 %. A coluna A representa o padrão de massa molecular. As colunas 1 e 2 representam o tempo 0 hora após indução sendo o sobrenadante de cultura e lisado total, respectivamente; as colunas 3 e 4 representam a fração induzida após uma hora de cultura, com uma seta indicando a banda de interesse; as colunas 5 e 6 representam a fração não induzida após uma hora de cultura; as colunas 7 e 8 representam a fração induzida após duas horas de cultura.	53
<b>Figura 12.</b>	Purificação da re-Rv1419p por cromatografia de afinidade. A análise das frações eluídas da coluna de níquel foi feita em SDS-PAGE a 12 %. A coluna A é marcador de massa molecular. As colunas de 1 a 5 compreendem as frações de lavagem com imidazol 500 mM correspondentes ao pico de eluição. A proteína re-Rv1419p está indicada pela seta.	54
<b>Figura 13.</b>	Nova purificação da proteína re-Rv1419p. A análise das frações eluídas da coluna de níquel foi feita em SDS-PAGE a 12%. A coluna A representa o marcador de massa molecular. A coluna 1 é representativa das frações eluídas e mostra que nova a estratégia utilizada na purificação resultou em uma fração livre de proteínas contaminantes.	55
<b>Figura 14.</b>	<i>Western-blot</i> para a proteína re-Rv1419p e para frações protéicas do <i>M. tuberculosis</i> . O <i>Western-blot</i> foi realizado com soro de coelho proveniente de sensibilizações com a proteína re-Rv1419p. As colunas 1 e 2 representam alíquotas da re-Rv1419p (2 µg) de uma mesma fração. A coluna 3 representa o filtrado de cultura do bacilo (10 µg) e a coluna 4 o lisado total da micobactéria (10 µg).	56
<b>Figura 15.</b>	Ensaio de hemaglutinação da re-Rv1419p. Utilizaram-se diferentes concentrações da proteína recombinante para simples checagem frente a suspensão de 2% de eritrócitos de coelho. A figura 15A é o controle negativo; a figura 15B é o controle positivo feito com uma lectina de leguminosa; as figuras 15C e	

	15D representam as doses de 2,5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, na condição de hemácias normais; as figuras 15E e 15F representam as doses de 2,5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, na condição de hemácias tratadas.	57
<b>Figura 16.</b>	Análise por imunofluorescência. Esta análise revelou que a proteína re-Rv1419p interage com a superfície de células J774 em cultura. A figura 16A é representativa do ensaio realizado com soro policlonal produzido em coelho contra a proteína recombinante, sendo observada a presença de marcação. A figura 16B é representativa do mesmo ensaio sendo utilizado um soro pré-imune do mesmo animal como controle. As fotos foram tiradas no microscópio de fluorescência (objetiva 100x).	58
<b>Figura 17.</b>	Secreção de TNF- $\alpha$ por macrófagos J774 no sobrenadante de cultura. Os sobrenadantes foram coletados nos tempos de 6, 12 e 24 horas e a dosagem de TNF- $\alpha$ foi realizada por meio de ELISA. Os valores representam a média +/- erro padrão. As dosagens foram realizadas em triplicata para cada condição. Os resultados representam uma média de duas dosagens independentes. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, (**p<0.01).	59
<b>Figura 18.</b>	Secreção de TNF- $\alpha$ por macrófagos J774 no sobrenadante de cultura. Os sobrenadantes foram coletados no tempo de 6 horas e a dosagem de TNF- $\alpha$ foi realizada por meio de ELISA. Os valores representam a média +/- erro padrão. As dosagens foram realizadas em triplicata para cada condição. Os resultados representam uma média de duas dosagens independentes. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, (*p<0,05).	60
<b>Figura 19.</b>	Secreção de TNF- $\alpha$ por macrófagos J774 no sobrenadante de cultura. Os sobrenadantes foram coletados no tempo de 6 horas e a dosagem de TNF- $\alpha$ foi realizada por meio de ELISA. Os valores representam a média +/- erro padrão. As dosagens foram realizadas em triplicata para cada condição. Os resultados representam uma média de duas dosagens independentes. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Mann Whitney, (**p<0.01).	61
<b>Figura 20.</b>	Secreção de TNF- $\alpha$ por macrófagos J774 no sobrenadante de cultura. Os sobrenadantes foram coletados no tempo de 6 horas e a dosagem de TNF- $\alpha$ foi realizada por meio de ELISA. Os valores representam a média +/- erro padrão. As dosagens foram realizadas em triplicata para cada condição. Os resultados representam uma média de duas dosagens independentes. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Mann Whitney (*p<0.05).	62

<b>Figura 21.</b>	Produção basal de IL-10, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ nos grupos TB (■, n=11) e Vol. (▲, n=11). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 48 horas de estímulo e o método de CBA foi utilizado para a dosagem de citocinas. A barra representa a mediana dos valores. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Mann Whitney (*p<0.05; ***p<0.001).	63
<b>Figura 22.</b>	Produção de IL-10 frente aos antígenos re-Rv1419p e CFP nos grupos TB (■, n=11) e Vol. (▲, n=11). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 48 horas de estímulo e o método de CBA foi utilizado para a dosagem de IL-10. A barra representa a mediana dos valores. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Mann Whitney (*p<0.05).	64
<b>Figura 23.</b>	Produção de TNF- $\alpha$ frente aos antígenos re-Rv1419p e CFP nos grupos TB (■, n=11) e Vol. (▲, n=11). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 48 horas de estímulo e o método de CBA foi utilizado para a dosagem de TNF- $\alpha$ . A barra representa a mediana dos valores. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Mann Whitney (***p<0.001).	65
<b>Figura 24.</b>	Produção de IFN- $\gamma$ frente aos antígenos re-Rv1419p e CFP nos grupos TB (■, n=11) e Vol. (▲, n=11). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 48 horas de estímulo e o método de CBA foi utilizado para a dosagem de IFN- $\gamma$ . A barra representa a mediana dos valores. Não houve diferença estatística entre os grupos analisados.	66

## RESUMO

---

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DO GENE RV1419 DE *Mycobacterium tuberculosis*. LUCAS DE LIMA NOGUEIRA. A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por um patógeno exclusivamente humano, o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Nosso objetivo foi avaliar se uma nova lectina do Mtb, Rv1419p, apresenta um papel modulatório em macrófagos J774 *in vitro* assim como investigamos a resposta imune celular de pacientes com tuberculose a essa proteína. Um banco de dados de lectinas, de diferentes espécies, foi construído para a mineração das seqüências de proteínas hipotéticas que foram geradas a partir da análise do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Identificamos uma proteína hipotética codificada pelo gene Rv1419 e produzimos a proteína recombinante. Observamos que a produção de TNF- $\alpha$  induzida pela proteína recombinante foi dependente do tempo e da dose, mas independente do domínio lectínico. Observamos também por imunofluorescência que a proteína recombinante foi capaz de interagir com a superfície celular de macrófagos J774 em cultura. Em adição, observamos que níveis detectáveis de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e Th2 (IL-10) foram secretadas por CMSP de pacientes com tuberculose em resposta a proteínas do filtrado de cultura do bacilo (CFP) e à proteína recombinante, demonstrando que a Rv1419p é capaz de induzir uma resposta imune celular em pacientes com tuberculose.

PALAVRAS CHAVE: *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculose. Lectinas. Bioinformática.

## ABSTRACT

---

CLONING, EXPRESSION AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF RV1419 GENE FROM *Mycobacterium tuberculosis*. **LUCAS DE LIMA NOGUEIRA.** Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, which is an obligatory human pathogen. Our objective was to evaluate whether one novel lectin from *M. tuberculosis*, Rv1419p, have a modulatory role in macrophages J774 *in vitro*. Moreover, we investigated the cellular immune response of TB patients. A data base of lectins from different species was carried out in order to search hypothetical protein sequences that were generated from the analysis of the *M. tuberculosis* H37Rv genome. We identified a hypothetical protein codified by Rv1419 gene and the recombinant protein production was then performed. We observed that TNF- $\alpha$  production induced by re-Rv1419p was time and dose-dependent, but lectin-independent. In parallel experiments, we observed that re-Rv1419p was able to interact with J774 macrophages, particularly at a cell surface level. In addition, we observed that detectable levels of Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e Th2 (IL-10) cytokines were secreted by PBMC of TB patients in response to culture filtrate proteins (CFP), which are known to contribute to the immunology of tuberculosis, and single antigen (re-Rv1419p). These results indicate that the Rv1419p was able to induce immune cellular responses in TB patients.

**KEY WORDS:** *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. Lectins. Bioinformatics.



# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por um patógeno exclusivamente humano, o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (GLICKMAN et al., 2001). A OMS (Organização Mundial de Saúde, 2006) estimou em oito a nove milhões os casos novos de tuberculose em 2004, causando cerca de dois milhões de mortes no referido ano. A OMS esclarece ainda que há 22 países que possuem altas taxas de incidência por ano, contribuindo com aproximadamente 80% de todos os casos novos registrados no mundo anualmente. O Brasil encontra-se na décima sexta posição com uma incidência de 60 casos por 100.000 habitantes (todas as formas de tuberculose). Além disso, a situação é agravada pelo surgimento de cepas de *Mtb* que são resistentes a antibióticos, pela co-infecção de pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (GIRARD et al., 2005) e pela desnutrição, que assola várias regiões de nosso país.

A quimioterapia constitui a principal medida terapêutica, mas o tratamento, que envolve pelo menos três drogas durante seis meses, é freqüentemente abandonado, o que pode resultar no surgimento de cepas resistentes (GIRARD et al., 2005). O *Mycobacterium bovis* BCG é a única vacina disponível contra a tuberculose, no entanto a proteção oferecida é altamente variável (ELLNER, 1997). Portanto, existe uma necessidade em identificar e avaliar novos antígenos de *M. tuberculosis* com potencial para o desenvolvimento de drogas e vacinas efetivas (AL-ATTIYAH et al., 2004).

## 1.2 BREVE HISTÓRICO

O gênero *Mycobacterium* pode ter se originado há mais de 150 milhões de anos atrás (DANIEL, 2006). De fato, a cepa ancestral que deu origem ao *Mtb* esteve, provavelmente, presente numa época em que havia homínídeos primitivos no leste africano, tendo co-evoluído com os mesmos há três milhões de anos, sendo que as espécies que compõem o complexo do *Mtb* parecem ter se originado a partir de um progenitor comum há cerca de 15.000-35.000 anos (GUTIERREZ et al., 2005).

O advento da biologia molecular tornou possível o desenvolvimento de técnicas que identificam amostras residuais de DNA microbiano em amostras antigas (DRANCOURT et al., 2005). De fato, a infecção por *Mtb* parece ser um bom modelo para o estudo de DNA residual, uma vez que em lesões localizadas, devido à natureza do processo patológico da infecção no hospedeiro, é possível encontrar DNA residual microbiano. Dessa forma, alguns trabalhos na literatura demonstraram que a tuberculose é uma doença antiga, com larga distribuição geográfica (DONOGHUE et al., 2004; SALO et al., 1994; ZINK et al., 2003).

### 1.3 SITUAÇÃO DA TUBERCULOSE NO MUNDO

A tuberculose continua sendo um grande problema de saúde pública apesar da existência de uma vacina e de drogas efetivas há mais de 50 anos. Se um indivíduo com a doença ativa não for tratado, ou abandonar o tratamento, irá infectar em média de 10 a 15 pessoas por ano (DYE et al., 2005). Em adição, a doença possivelmente tem um impacto no desenvolvimento sócio-econômico. De fato, segundo DYE et al., (2005), 75% das pessoas com tuberculose estão no grupo etário de 15 a 54 anos da população economicamente ativa. A OMS (2006) esclarece ainda que 95% dos casos e 99% de todas as mortes por tuberculose ocorrem em países em desenvolvimento, o que de certa forma é alarmante e mostra a necessidade de melhores medidas no controle e tratamento da tuberculose.

Na maioria dos países, os casos de tuberculose são mais freqüentes entre homens do que mulheres. Esse padrão parece refletir diferenças epidemiológicas reais entre os sexos, tanto no que diz respeito a exposição à infecção como na susceptibilidade à doença. Em regiões onde a transmissão do *M. tuberculosis* é estável, a taxa de incidência é alta entre adultos jovens, sendo que a maioria dos casos se deve a infecção recente ou reinfeção. Entretanto, quando a taxa de transmissão decai, uma grande proporção dos casos é proveniente da reativação de uma infecção latente em adultos mais velhos (BORGDORFF et al., 2000).

A Organização Mundial da Saúde (2006) estimou nove milhões de casos novos em 2004 (140/100.000 habitantes), tendo quatro milhões dos casos apresentado positividade para bacilos álcool-ácido resistentes em secreções pulmonares, que é considerada a forma mais infecciosa e comum da doença (Figura 1).

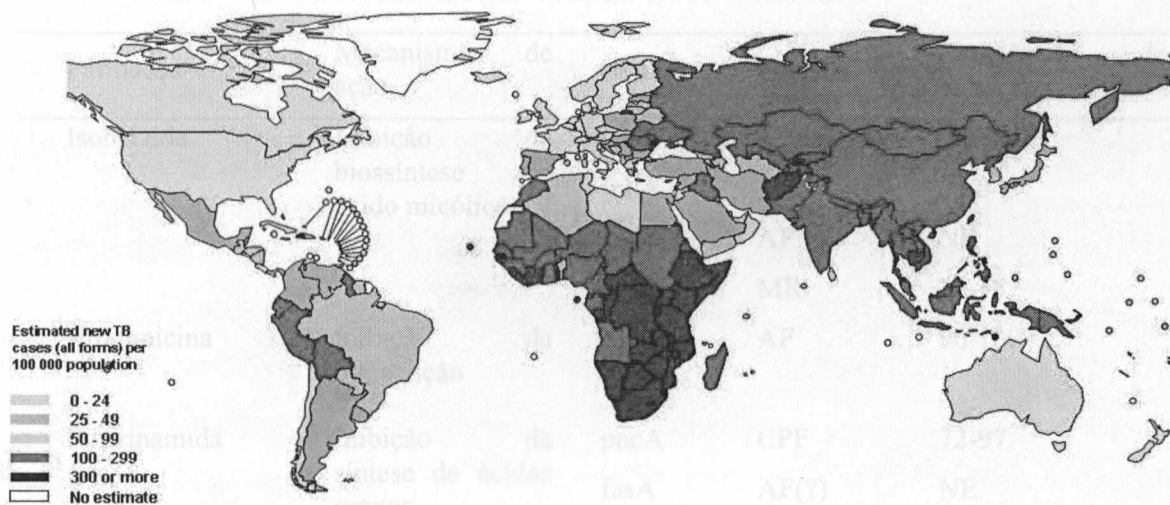


Figura 1. Taxas estimadas de incidência da tuberculose em 2004.

#### 1.4 RESISTÊNCIA A DROGAS EM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

*Mtb* e outros membros do complexo (*M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii* e *M. africanum*) utilizam diversas estratégias para resistir à ação de agentes antimicrobianos. Entre as diferentes estratégias destaca-se o mecanismo de defesa inata no qual a célula micobacteriana é formada por uma parede celular altamente hidrofóbica e espessa, o que resulta na diminuição da permeabilidade a várias drogas (JARLIER & NIKAIIDO, 1994; LEE et al., 1996). Também já foram descritos os sistemas ativos de efluxo de drogas e enzimas que inativam ou degradam antibióticos em *M. tuberculosis* (KWON et al., 1995; COLE et al., 1998). No entanto, estudos genéticos revelaram que a resistência às drogas antimicobacterianas pode ser uma consequência de mutações espontâneas em genes que codificam o alvo da droga ou para enzimas que estão envolvidas na ativação da droga (Tab. 1). A resistência associada a mutações pontuais, deleções ou inserções tem sido evidenciada para todas as drogas de primeira linha empregadas no tratamento da tuberculose (isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina) (ZHANG & TELENTI, 2000).

Casos de resistência envolvendo as duas mais importantes drogas, rifampicina (RMP) e isoniazida (INH), são definidas como tuberculose multirresistente, sendo o tratamento difícil e de custo elevado (DYE et al., 2002).

Tab. 1. Mecanismos de resistência aos fármacos em *M. tuberculosis*

Fármacos	Mecanismo de ação	de	Genes	Função	Frequência de mutações (%)
Isoniazida	Inibição da biossíntese do ácido micólico	da do	katG	CPF	42-58
			InhA	AF	21-34
			kasC	AF	NE
			ahpC	MR	10-15
Rifampicina	Inibição da transcrição	da	rpoB	AF	96-100
Pirazinamida	Inibição da síntese de ácidos graxos	da	pncA	CPF	72-97
			fasA	AF(?)	NE
Etambutol	Inibição da síntese de arabinogalactan	da de	embCA B	AF	47-65
Estreptomicina	Inibição da síntese protéica	da	rpsL	AF	52-59
			rrs (16S RNA)	AF	8-21

AF: Alvo do fármaco

CPF: Conversão do pró-fármaco

MR: Marcador de resistência

NE: Não estabelecido

Baseado em ROSSETTI et al., 2002.

A presença de linhagens multirresistentes é um reflexo da deficiência nos programas de controle da tuberculose, o que dificulta o tratamento e a prevenção da doença, promovendo assim a sua disseminação. O esquema terapêutico consiste, basicamente, em uma associação de fármacos, geralmente INH, RMP e pirazinamida (PZA), durante dois meses, seguido por quatro meses com INH e RMP. Situações como monoterapia, prescrição não apropriada dessa associação ou falta de colaboração do paciente podem levar ao surgimento de linhagens multirresistentes (ROSSETTI *et al.*, 2002). A partir dessas considerações, a realização do teste de sensibilidade às drogas é muito importante para o tratamento correto dos pacientes e para o monitoramento dos níveis de resistência.

## 1.5 CO-INFECÇÃO COM HIV E PATOGÊNESE

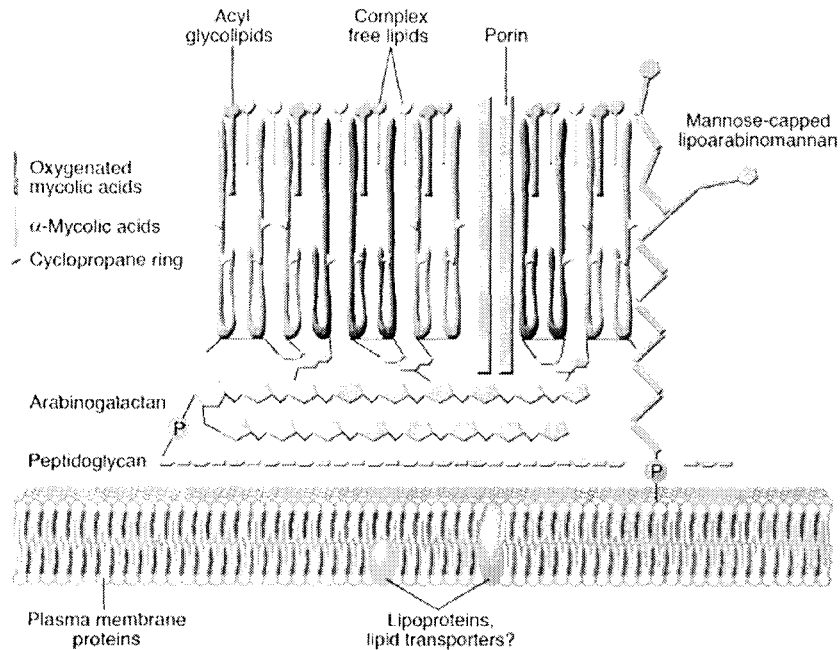
Entre os vírus HIV, o vírus HIV-1 têm mostrado influenciar o curso clínico da infecção por *M. tuberculosis* (CORBETT et al., 2002). Estes patógenos são co-endêmicos em muitas áreas do mundo e pacientes que estão infectados simultaneamente com estes dois patógenos exibem maior morbidez e mortalidade do que os indivíduos que abrigam um ou outro patógeno sozinho (COLLINS et al., 2002; DEL AMO et al., 1999). A produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), a ativação de macrófagos por linfócitos CD4<sup>+</sup> são importantes para o controle da doença. Nos pacientes com tuberculose co-infectados com HIV esta resposta imune é comprometida (TOOSSI, 2003). Além disso, o *M. tuberculosis* pode induzir a expressão do HIV tanto pela via independente (BAFICA et al., 2003) como pela via dependente de TNF (TOOSSI, 2003; BAFICA et al., 2004). Uma elevada replicação do HIV pode levar a um decréscimo nos níveis de células T CD4<sup>+</sup>, o que pode afetar a formação do granuloma e síntese de IFN- $\gamma$  (LAURENCE, 1992), sugerindo que ambas as patologias podem influenciar o curso clínico de cada doença. Em adição, foi demonstrado que a produção *in situ* de TNF em granulomas de pacientes com tuberculose pulmonar é comprometida em casos de co-infecção com o vírus HIV-1, sendo observado necrose extensa, granulomas mal formados e presença marcante de células polimorfonucleares no pulmão desses indivíduos (NORONHA et al., 2008).

Os linfócitos T são os principais efetores da imunidade mediada por célula na tuberculose (SILVA et al., 2001). Baseado na secreção de citocinas, pelo menos duas variantes de linfócitos T *helpers* são reconhecidos: Th1, que secreta IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2 e TNF- $\alpha$ , e Th2, que secreta IL-4 e IL-10. Um desequilíbrio no balanço Th1/Th2 pode afetar o desenvolvimento da doença (VERBON et al., 1999). Dessa maneira, TNF- $\alpha$ , uma citocina com efeitos pró-inflamatório e imunoregulatório, exerce um papel chave na iniciação, regulação e perpetuação da resposta inflamatória, considerando que a IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias em linfócitos Th1 e macrófagos (DE WAAL MALEFYT et al., 1991; FIORENTINO et al., 1991). Portanto, o desfecho de uma infecção causada por micobactéria é provavelmente regulada por uma complexa rede envolvendo citocinas com efeitos estimulatórios e inibitórios

## 1.6 O GÊNERO *MYCOBACTERIUM*

Na ordem Actinomycetales, o gênero *Mycobacterium* é o único gênero pertencente à família Mycobacteriaceae (WAYNE, 1986). O gênero *Mycobacterium* é dividido em pelo menos 85 espécies (RASGOTI *et al.*, 2001). As principais espécies de interesse clínico são *M. tuberculosis* e *M. leprae* que causam tuberculose e hanseníase, respectivamente. O gênero pode ser classificado em relação ao potencial patogênico para o homem e também com relação às características de crescimento em condições ótimas *in vitro*. Portanto, as espécies de micobactérias podem ser classificadas como sendo de crescimento lento ou de crescimento rápido. As de crescimento lento usualmente possuem um tempo de geração de 24 horas em meio sintético e requerem de duas a seis semanas para formarem colônias visíveis, enquanto que as de crescimento rápido possuem um tempo de geração de três a quatro horas e mostram colônias de dois a sete dias. *M. tuberculosis* é considerada uma bactéria de crescimento lento enquanto que *M. smegmatis* é de crescimento rápido (GRANGE, 1996).

As bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium* consistem de bacilos aeróbios imóveis e não formadores de esporos, medindo 0,2 a 0,6 x 1 a 10  $\mu\text{m}$ . A parede celular é rica em lipídios, tornando as micobactérias resistentes a numerosos desinfetantes, bem como às colorações laboratoriais comuns. Uma vez corados, os bacilos também são resistentes à descoloração com soluções ácidas e álcoois, daí o nome bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). A estrutura básica da parede celular é típica de bactérias Gram-positivas. Entretanto, o esqueleto de peptidoglicano está ligado de modo covalente a moléculas de ácido micólico-arabinogalactano e é recoberto por lipídios livres e polipeptídios (Figura 2) (RILEY, 2006; GLICKMAN & JACOBS, 2001).



**Figura 2.** Representação esquemática do envelope celular do *Mtb* mostrando a diversidade química de moléculas de lipídios e glicolipídios, incluindo ácidos micólicos, membrana celular, camada de peptidoglicano e moléculas de ácido micólico-arabinogalactano (Riley, 2006).

## 1.7 BIOLOGIA MOLECULAR DE MICOBACTÉRIAS

Com a conclusão do sequenciamento do genoma de duas cepas de *Mtb* (H37Rv e CDC1551) (COLE et al., 1998; FLEISCHMANN et al., 2002) e de dois patógenos relacionados (*Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium bovis*) (COLE et al., 2001; GARNIER et al., 2003), a informação contida no genoma está tendo um grande impacto no entendimento da biologia do *Mtb*. Em adição, o aumento da disponibilidade de dados de projetos genoma fez desse patógeno um sistema modelo para iniciativas em genômica estrutural e proteômica (JUNGBLUT et al, 2001; GOULDING et al., 2002). Muitas dessas iniciativas concentram-se em resolver estruturas de proteínas com dobramentos novos que sejam potenciais alvos para novas drogas e vacinas (SMITH & SACCHETTINI, 2003).

### 1.7.1 O GENOMA DE *M. TUBERCULOSIS*

O genoma do *Mtb* H37Rv consiste de um cromossomo circular que é rico em seqüências repetitivas. As principais repetições identificadas são a seqüência de inserção IS6110 e a seqüência polimórfica rica em G + C (PGRS) (POULET & COLE, 1995). Outro aspecto distinto do genoma de *M. tuberculosis* é a presença de um operon rRNA localizado a 1.5 Mpb da origem de replicação (*oriC*). Normalmente em bactérias que crescem rapidamente, mais do que um operon rRNA pode ser identificado e localizado a uma pequena distância da *oriC* (BLATTNER et al., 1997; PARKHILL et al., 2001).

*Mtb* H37Rv contém 56 cópias de seqüências de inserção pertencentes à nove famílias diferentes (GORDON et al., 1999), a IS6110 é a mais comum com 16 cópias no genoma. A maioria das seqüências de inserção identificadas não havia sido descritas previamente na literatura e apresentam características de elementos móveis. Entretanto, SREEVATSAN et al., (1997) sugeriram que o número de seqüências de inserção, particularmente IS6110, está relacionado com a evolução desta bactéria. Além disso, a transposição de IS6110 e outros elementos móveis parecem ser responsáveis em parte pela evolução de novos subclones de *M. tuberculosis* (STREEVATSAN et al., 1997).

O genoma tem o potencial para codificar aproximadamente quatro mil ORFs. Porém, somente 63,78% das proteínas preditas apresentam uma função específica conhecida (Disponível em: <<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>> Acesso em 20/10/2004). Os genes são classificados em 12 grupos funcionais diferentes (Tab. 2), sendo 24,42% dos genes pertencentes à classe hipotéticas conservadas, com baixa similaridade com proteínas de outros organismos. Em adição, o genoma do *Mtb* é abundante em genes envolvidos no metabolismo de lipídios e regulação geral (TEKAIA et al., 1999)

*Mtb* pode metabolizar uma variedade de carboidratos e hidrocarbonos e também apresenta um grande potencial anabólico, sendo capaz de utilizar diversos compostos de carbono e crescer em meios com glicerol como única fonte de carbono. Estas características sugerem que *M. tuberculosis* mudou seu modo de vida de um saprófita do solo para um patógeno obrigatório (SREEVATSAN et al., 1997; NORMAN et al., 1994).



Tab. 2. Classificação geral das proteínas de *M. tuberculosis*

<b>Categoria funcional</b>	<b>Número de genes</b>	<b>% Total</b>
Virulência, detoxificação e adaptação	102	2,52
Metabolismo de lipídios	237	5,85
Vias de informação	232	5,73
Parede celular e processos celulares	751	18,55
RNAs estáveis	50	1,23
Seqüências de inserção e fagos	148	3,65
PE/PPE	168	4,15
Metabolismo intermediário e respiração	895	22,10
Desconhecido	15	0,37
Proteínas regulatórias	192	4,74
Hipotéticas conservadas	989	24,42
Hipotéticas conservadas com um ortólogo em <i>Mycobacterium bovis</i>	270	6,67
<b>Total</b>	<b>4.049</b>	<b>100</b>

Baseado em COLE et al., 1998.

Aproximadamente 18% das seqüências codificantes estão envolvidas na síntese da parede celular e 6% no metabolismo de lipídios. No último caso, muitas enzimas estão envolvidas no catabolismo de ácidos graxos. Cole e colaboradores (1998) relataram que existem cerca de 100 genes codificando enzimas, incluindo as proteínas FadA/FadB, que catalizam os passos do ciclo da  $\beta$ -oxidação no alongamento da cadeia de ácidos graxos, tais como os ácidos micólicos (CHOI et al., 2000).

Cerca de 4% da capacidade codificante desta bactéria é representada por duas grandes famílias de proteínas ricas em glicina e alanina, chamadas de proteínas Pro-Glu (PE) e Pro-Pro-Glu (PPE). Estes genes são estreitamente relacionados às seqüências polimórficas repetitivas referidas como PGRSs e repetições polimórficas aleatórias principais (MPTRs) (POULET & COLE, 1995). A família PE é dividida em três classes, a primeira compreende 29 proteínas. A segunda classe apresenta 63 polipeptídeos pertencentes à subfamília PGRS, que é caracterizada pelo alto teor de glicina. A terceira classe é caracterizada por um único domínio de cerca de 200 resíduos de aminoácidos.

Estas proteínas podem ter um papel na apresentação de antígenos, facilitando a replicação da bactéria no macrófago (RAMAKRISHNAN et al., 2000). Porém, foi sugerido que os membros da PGRS e MPTR podem contribuir para a variação antigênica

da bactéria como um mecanismo de evasão às respostas imunes do hospedeiro (COLE et al., 1998; ESPITIA et al., 1999).

### 1.7.2 O papel de alguns genes envolvidos na virulência

*M. tuberculosis* é um patógeno intracelular, sendo capaz de sobreviver e replicar no interior de macrófagos. O patógeno é também capaz de se proteger pela produção de fatores de virulência, o que permite a replicação da bactéria no interior do fagolisossomo. No entanto, ao contrário de outros patógenos humanos, *M. tuberculosis* não produz toxinas (COLE, 1998). Para um melhor entendimento das bases moleculares da virulência é necessário a identificação de genes envolvidos na patogênese. Baseado na homologia com genes de virulência de outras bactérias foram identificados no genoma de *M. tuberculosis* fatores de virulência putativos ou reguladores de fatores de virulência. Estes incluem genes codificando fosfolipases C, enzimas anti-oxidantes, fatores sigma, fatores de colonização em macrófagos e lectinas (COLLINS, 1996; SINGH et al., 2005).

### 1.7.3 Enzimas antioxidantes

Genes e fatores de virulência envolvidos na proteção contra o estresse oxidativo possuem um papel na detoxificação de espécies reativas de oxigênio e intermediários de nitrogênio encontrados em macrófagos infectados. Curiosamente, em contraste com outras micobactérias saprófitas, *M. tuberculosis* não possui uma cópia intacta do gene *oxyR* (PAGAN-RAMOS et al., 1998) que é tanto um sensor do estresse oxidativo como um ativador transcricional, induzindo a expressão de uma catalase (*KatG*) e alquil hidropoxidase (*ahpC*). Contudo, mesmo sem o gene *oxyR*, *M. tuberculosis* é capaz de expressar o gene *KatG*, que codifica para uma proteína com atividade de catalase e peroxidase.

A principal droga usada contra a tuberculose, a isoniazida, é convertida de uma forma inativa para uma ativa pela enzima catalase-peroxidase (*KatG*). Uma vez ativada, a isoniazida inibe a biossíntese de ácidos micólicos da parede celular, levando à morte celular (DERETIC et al., 1996). No entanto, isolados clínicos de *M. tuberculosis* que apresentam mutações no gene *KatG* foram encontrados (ZHANG et al., 1996; HEYM et al., 1995). Nesses isolados, a bactéria pode compensar a perda do *KatG* pela super-expressão do gene *ahpC* (HEYM et al., 1997; SHERMAN et al., 1999), levando-a a

sobreviver e persistir no interior de células fagocíticas. Porém, em um estudo separado com um mutante de *M. tuberculosis* para o gene *ahpC*, foi demonstrado um papel não significativo na virulência, ao menos durante a fase aguda da infecção em camundongos (SPRINGER et al., 2001).

#### 1.7.4 Genes relacionados à invasão celular

O estudo de genes que codificam proteínas envolvidas na sobrevivência de *M. tuberculosis* em macrófagos ajudou a identificar potenciais fatores de virulência. Outro exemplo para esse tipo de abordagem é o gene *mce* (mycobacterial cell entry gene) (ARRUDA et al., 1993). Um mutante para esse gene construído em *M. bovis* exibiu um fenótipo atenuado (FLESSELLES et al., 1999). A bactéria mutante para o *mce* mostrou cerca de 50% de redução na habilidade de invadir células epiteliais (células HeLa), sugerindo que este gene possui um papel importante na iniciação da endocitose. As análises do genoma de *M. tuberculosis* indicaram que existem quatro genes homólogos nesta família (*mce1*, *mce2*, *mce3* e *mce4*), cada um localizado em operons separados contendo genes adicionais (COLE et al., 1998). Além disso, estes operons codificam para um conjunto de proteínas contendo seqüências sinais ou resíduos hidrofóbicos preditos, sugerindo que estas podem ser secretadas ou expressadas na superfície da bactéria. A função para essa família de proteínas é completamente obscura, mas pelo menos para o *mce1*, este parece promover mudanças na membrana plasmática em células de mamíferos que facilitam a entrada de produtos unidos ao mesmo (CHITALE et al., 2001).

#### 1.7.5 Lectinas

As interações moleculares baseadas no reconhecimento específico entre lectinas e glicanos desempenham um papel chave em numerosos processos biológicos. Isto se deve, em parte, ao enorme potencial codificador de informações biológicas das estruturas dos glicanos em comparação com outras macromoléculas, como as proteínas e os ácidos nucléicos.

A ubiquidade das lectinas reflete sua participação efetiva em atividades celulares muito diversas, operando em diferentes processos intracelulares e intercelulares, tanto fisiológicos como patológicos. O patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* sintetiza lectinas que se une a D-galactose e L-fucose utilizadas para colonizar o tecido pulmonar

(MITCHELL et al., 2002). Numerosos agentes patogênicos utilizam as estruturas dos glicanos para a ancoragem na superfície celular, antecedendo ao processo de infecção, a saber: *Plasmodium falciparum* (agente causal da malária), parasitas do gênero *Leishmania* (responsáveis pelas leishmanioses), *Entamoeba histolytica* (agente causal da amebíase), *Helicobacter pylori*, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* (responsáveis por transtornos gastrointestinais), *Streptococcus pneumoniae* ou *Trypanosoma cruzi* (protozoário responsável pelo mal de Chagas) (JACOBSON & DOYLE, 1996).

No caso do Mtb, uma lectina já foi identificada e caracterizada como crucial nos eventos de disseminação extrapulmonar (HBHA – “*Heparin-binding hemagglutinin*”), sendo uma proteína essencial na interação com células do epitélio pulmonar (LOCHT et al., 2006). Entretanto, esse fato não exclui a possibilidade de outras lectinas estarem envolvidas no processo inicial de infecção ou mesmo na fase crônica da doença, o que seria válido para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas, como o desenvolvimento de drogas inibitórias, em indivíduos cronicamente infectados. Portanto, a identificação de novas lectinas no *M. tuberculosis* e um conhecimento detalhado das bases moleculares das interações dessas proteínas e glicanos tornam-se necessários e estratégicos para abordar os processos biológicos e patológicos nos quais estas lectinas participam.

### 1.8 Identificação de genes de virulência

Após o genoma de *M. tuberculosis* ser seqüenciado e publicado, a função de muitos genes foi descrita como “genes de virulência putativos” e muitos ainda são considerados de função desconhecida. A descrição desses genes é baseada no grau de similaridade com genes encontrados em outras espécies de bactérias. Porém, para um gene ser definido como um fator de virulência é preciso que o fenótipo esteja associado a uma cepa virulenta, a inativação do gene deve levar a atenuação, e a re-introdução do gene deve restaurar o fenótipo de patogenicidade, segundo os postulados moleculares de Koch (FALKOW, 1988). Tais genes podem estar envolvidos diretamente ou podem regular outros genes que possuem um papel na infecção. Além disso, é importante identificar os mecanismos regulatórios que controlam a expressão de genes de virulência em diferentes condições do ambiente, pois alguns desses genes podem ser expressos somente em determinadas condições. Mutagênese por troca alélica (REYRAT et al., 1998), mutagênese por inserção aleatória no genoma (Transposon) (COLLINS & GICQUEL, 2000; PELICIC et al., 1997), hibridização subtrativa (DIATCHENKO et al., 1996; GURSKAYA et al., 1996; LAI et al.,

2000) e análise comparativa utilizando microarranjos de DNA (KATO-MAEDA et al., 2001; MAUGHAN et al., 2001) são exemplos de técnicas para o estudo da relação de genes com a virulência.

### 1.8.1 Ferramentas de bioinformática

A predição de genes pode ser caracterizada pela seleção individual de resultados de pesquisas em homologia e predições *ab initio* e pelo alinhamento desses resultados com uma seqüência genômica, o que fornecerá predições sobre a estrutura gênica (RUST et al., 2002). A fonte de dados para pesquisa em homologia pode ser tanto de proteínas como de DNA (BAIROCH & APWEILER, 2000; STOESSER et al., 2002; BENSON, et al., 2002), sendo que cada classe de resultados é analisada separadamente. Em muitos casos, a predição gênica final é alcançada pela compilação dos dados de alinhamento de diferentes técnicas para produzir transcritos plausíveis (BURGE & KARLIN, 1997; XU & UBERBACHER, 1997; BIRNEY & DURBIN, 1997). O objetivo é minimizar a redundância originada da sobreposição de genes (RUST et al., 2002).

### 1.8.2 Anotação funcional de domínios protéicos

Os domínios de proteínas também são essenciais para a determinação da função dos genes preditos (RUST et al., 2002). Diferentes banco de dados podem ser usados para anotação, incluindo Pfam (BATEMAN, 2002), PRINTS (ATTWOOD et al., 2002), PROSITE (FALQUET et al., 2002), ProDom (CORPET et al., 2000), BLOCKS (HENIKOFF et al., 1999) e SMART (SCHULTZ et al., 2000). No entanto, esses bancos de dados foram designados para resolver problemas específicos e, portanto, possuem seus pontos fortes e fracos. Para resolver este problema, diferentes assinaturas de domínios protéicos estão sendo integrados no projeto Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), criando uma caracterização única para uma dada família de proteínas, domínio ou sitio funcional (APWEILER et al., 2000). Sendo assim, o uso do Interpro torna o processo de anotação funcional menos extensivo e menos redundante.

No presente estudo, nós avaliamos se uma nova lectina do *Mtb*, Rv1419p (encontrada no banco de dados de lectinas do nosso grupo), apresenta um papel modulatório em macrófagos J774 *in vitro* assim como investigamos a resposta imune

celular de pacientes com tuberculose. A nossa hipótese é de que lectinas patogênicas constitui um grupo de proteínas importantes na interação inicial do *Mtb* com células do hospedeiro. Assim, estes componentes lectínicos teriam o alto potencial de servir como alvos terapêuticos ou vacinais.

## 2 JUSTIFICATIVA

---

Especula-se que a interação do bacilo de Koch com células apresentadoras de antígeno (APC), como macrófagos, é essencial para a patogênese da doença. Desta maneira a micobactéria pode modular a resposta imune inata e se instalar no hospedeiro. A identificação de lectinas que podem estar envolvidas no processo inicial de infecção ou mesmo na fase crônica da doença seria importante para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

## 3 OBJETIVO GERAL

---

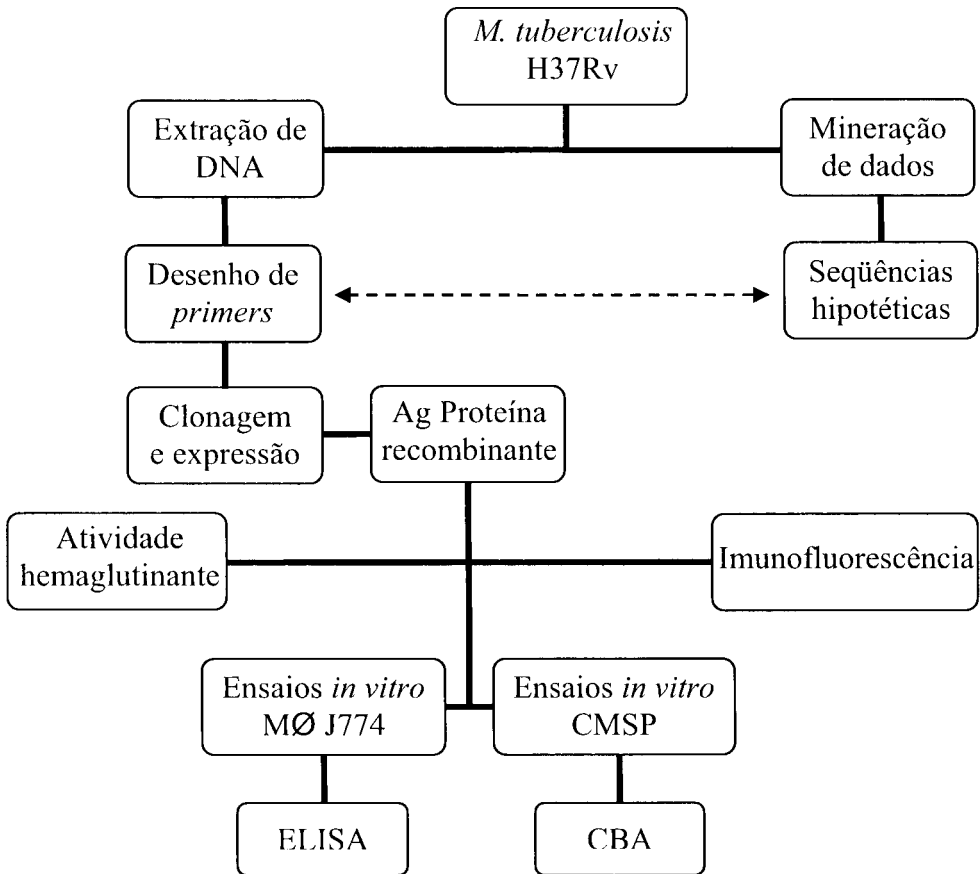
Clonar e expressar o gene *Rv1419* de *Mycobacterium tuberculosis* em *Escherichia coli* e avaliar a atividade hemaglutinante e potencial imunogênico da proteína recombinante.

### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fornecer informações estruturais de seqüências hipotéticas do *Mycobacterium tuberculosis* a respeito da presença de domínios de ligação a carboidratos por uma abordagem de bioinformática;
- Avaliar a expressão do gene *Rv1419* em *Escherichia coli* BL21 (DE3) e estabelecer o método mais adequado de produção e purificação da proteína recombinante;
- Determinar o potencial lectínico da proteína recombinante por meio de ensaios de atividade hemaglutinante;
- Determinar se a proteína recombinante é capaz de ativar células J774 de uma maneira dose/tempo-dependente através da dosagem de TNF no sobrenadante de cultura;
- Caracterizar o potencial imunogênico da proteína recombinante por meio de ensaios *in vitro*, a saber: estimular células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com tuberculose com a proteína recombinante e avaliar a secreção de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF, comparando com indivíduos sem histórico de tuberculose.

## 4 DESENHO EXPERIMENTAL

---





## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 5.1 CASUÍSTICA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Protocolo 219 (CAAE) 2221.0.000.225-06) e pelo Núcleo de Pesquisa em Pneumologia do Hospital Especializado Octávio Mangabeira (Parecer N° 01/2007).

Foram obtidos os consentimentos informados, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz e do Núcleo de Pesquisa em Pneumologia do HEOM, de todos os pacientes bem como dos voluntários que participaram como controle.

Os pacientes foram provenientes do Estado da Bahia e avaliados pelo Dr. Marcelo Chaloub no HEOM sendo que os que apresentaram teste positivo para HIV nos exames laboratoriais foram excluídos do estudo.

Um grupo controle composto por indivíduos saudáveis foi também avaliado pela Dra. Theolis Bessa em um projeto independente sendo que os que foram revacinados com a vacina BCG foram excluídos do estudo. Este grupo foi constituído por 11 doadores voluntários com idade variando entre 18 e 23 anos (média de 18,9 anos), sendo três do sexo masculino e oito do sexo feminino. Destes 11 doadores, seis apresentaram PPD+ no momento da coleta de sangue enquanto que o restante apresentou PPD-.

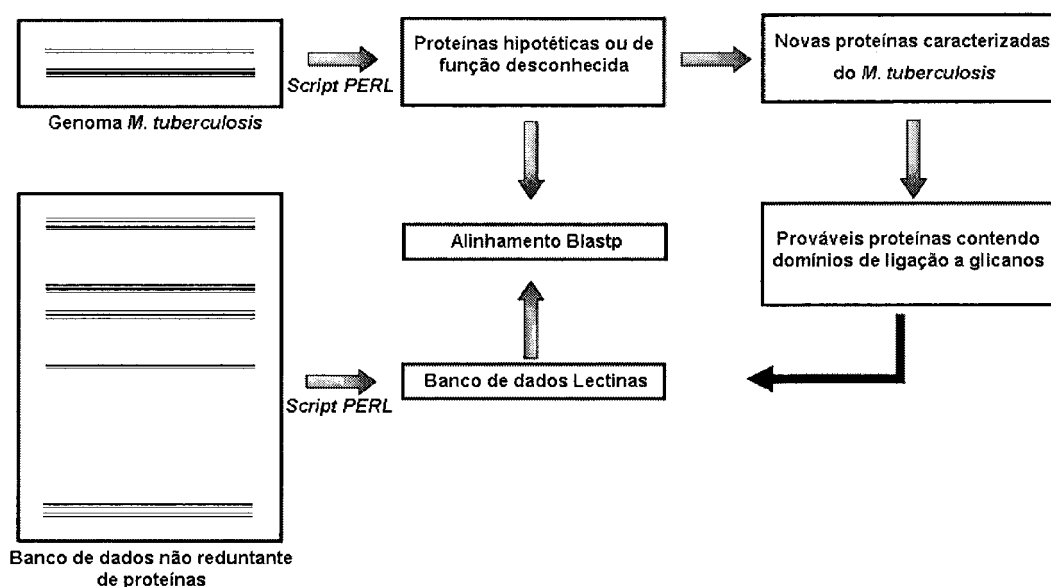
#### 5.1.1 Pacientes

Foram estudados 11 pacientes com tuberculose ativa com idade variando entre 28 e 62 anos (média de 47,6 anos), sendo oito do sexo masculino e três do sexo feminino, diagnosticados no Hospital Especializado Octávio Mangabeira, Salvador-BA.

O diagnóstico da tuberculose foi estabelecido por baciloscopia de escarro positiva em nove pacientes, cultura positiva para o *M. tuberculosis* em um paciente e biópsia óssea em um paciente. Todos os pacientes apresentaram imagem radiográfica compatível com tuberculose pulmonar e somente um paciente apresentou derrame pleural.

## 5.2 MINERAÇÃO DE DADOS

A mineração de dados do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv foi realizada segundo o método descrito por Moreno e colaboradores (MORENO et al., 2003). Basicamente, as seqüências de proteínas não reduntantes, e suas respectivas anotações, foram obtidas do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* Disponível em: <<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/>> Acesso em 20/10/2003) no formato FASTA para a construção do banco de dados de lectinas. O banco apresenta lectinas de diferentes organismos tais como bactérias, animais (vertebrados e invertebrados) e plantas, totalizando cerca de 1639 seqüências. A seqüência completa do genoma de *M. tuberculosis* foi obtida a partir da mesma fonte. Em adição, o BLAST foi utilizado para formatar essas seqüências de forma a permitir uma pesquisa por homologias através de uma execução local. Tanto o BLAST, que é uma ferramenta básica de alinhamento local, como CLUSTALW, que é uma ferramenta para o alinhamento múltiplo de seqüências, foram usados para estudos comparativos de ORFs (*Open Reading Frames*) ainda não classificadas ou caracterizadas como hipotéticas no genoma de *M. tuberculosis*. Em paralelo, foi desenvolvido um script PERL para a filtragem dessas seqüências hipotéticas e comparação local com o banco de dados de lectinas (Fig. 3)



**Figura 3.** Ilustração mostrando os passos utilizados para obtenção de seqüências hipotéticas do genoma de *M. tuberculosis* relacionadas às lectinas.

### 5.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O método utilizado para a extração do DNA genômico foi o método descrito por van Soolingen e colaboradores em 1991 (VAN SOOLINGEN et al., 1991). Brevemente, as suspensões bacterianas de *M. tuberculosis* foram transferidas para tubos de microcentrifugas estéreis (*eppendorfs*) de 2 mL contendo 500 µL de tampão TE (0,01 M Tris-HCl e 0,001 M EDTA pH 8) e aquecidas a 80°C por 20 min. Em seguida, após chegar à temperatura ambiente, foi adicionado lisozima (concentração final 1 mg mL<sup>-1</sup>), que foi homogeneizada por inversão do tubo, sendo esta incubada por 1 hora a 37°C na estufa bacteriológica. Em seguida, foram adicionados 70 µL de 10% SDS e 6µL de proteinase K 10 mg mL<sup>-1</sup> e a mistura foi incubada a 65 °C por 10 min no banho-maria. Após essa etapa, foi adicionado 80 µl de Brometo de *N*-cetyl-*N,N,N*-trimetil amônio a 10% e 100 µL de solução de NaCl 5 M, que foi agitado por inversão do tubo brevemente e novamente incubados por 10 min a 65°C no banho-maria.

Após o período de incubação, o DNA foi extraído com igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, vol/vol), homogeneizado cuidadosamente e em seguida foi submetido a centrifugação por 5 min a 14000 rpm em microcentrífuga. A fase superior aquosa contendo o DNA foi transferida para novo tubo sendo adicionado 0,6 volume de isopropanol e deixado 30 min a -20°C, seguido de centrifugação por 15 min. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de um pipetador. O sedimento foi então lavado com 250 µL de etanol 70% e deixado secar ao ar. Finalmente o DNA será dissolvido em 20 µL com 0,1× tampão TE (0,001 M Tris-HCl e 0,0001 M EDTA pH 8 e estocado em freezer -20°C). Para estimar a quantidade do DNA extraído foi medida a absorvância a 260 e 280 nm contra o tampão TE, utilizando-se o espectrofotômetro *GeneQuant* (GE Healthcare). A relação padrão de que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a aproximadamente 50 µg de DNA dupla fita por mL de solução foi considerada (SAMBROOK et al., 1989).

### 5.4 CONSTRUÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS E AMPLIFICAÇÃO DO GENE *Rv1419*

A seqüência nucleotídica da ORF *Rv1419* que codifica a proteína hipotética *Rv1419p* foi amplificada através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A Fig 4

demonstra a sequência codificadora da proteína *Rv1419p* como um exemplo da estratégia de amplificação para obtenção do gene de interesse deste estudo.

**ATGGGTGAATTACGGTTGGT**GGGCGGTGTGCTCCGGGTCTTGTCTGGTTCGGTTCGGTGT  
TCGATGTGGCGGTGCTAAACGCCGGTGC GGCTAGTGCCGACGGCCCGGTCCAGCTGAAGAG  
CCGATTGGGCGATGTTTGCCTGGACGCCCCGAGTGGGAGCTGGTTCAGCCCGCTGGTGATC  
AACCCCTGCAATGGGACCGACTTTCAGCGCTGGAATCTCACCGATGACCGGCAGGTTCGAGA  
GCGTGGCCTTCCCCGGGGAATGCGTGAATATCGGAAATGCTTTGTGGGCGCGCCTGCAGCC  
CTGTGTGAACTGGATCAGCCAGCACTGGACTGTCCAGCCCGACGGCCTGGTCAAGAGTGAT  
CTTGATGCCTGCCTCACGGTTCTCGGCGGTCCGGATCCTGGGACCTGGGTGTCCACCCGCT  
GGTGC GACCCCAATGCACCCGACCAACAGT**GGGATAGCGTGCCGTAA**

**Figura 4.** Sequência codificadora da ORF *Rv1419* (Mycobacterium tuberculosis Genome Project – número de acesso 38490250 no NCBI). A sequência possui 474 nucleotídeos que codificam para a proteína hipotética *Rv1419p*. Os nucleotídeos em negrito vermelho e azul correspondem aos códons de início e de parada da tradução, respectivamente. As seqüências em negrito representam os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* (5' e 3') utilizados como iniciadores (*primers*).

A estratégia basicamente resumiu-se em utilizar dois *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) complementares às extremidades 5' e 3' do gene alvo as quais hibridizavam com esta região e serviram como ponto de partida para a polimerização pela *Taq* DNA polimerase. O DNA genômico, isolado de acordo com van Soolingen (VAN SOOLINGEN et al., 1991), foi utilizado como molde para amplificação da ORF (seqüência completa) anotada no banco de dados genômico do *M. tuberculosis* (código de acesso 38490250 no NCBI). Os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* com sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *XhoI*, respectivamente, foram sintetizados e utilizados na amplificação a fim de facilitar a clonagem dentro dos vetores escolhidos. Estes oligonucleotídeos iniciadores estão listados na Tabela 3.

**Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação por PCR.** Os nucleotídeos em vermelho representam os códons de iniciação (*start codon*) e terminação presentes na sequência da ORF *Rv1419* na qual codificam para a metionina inicial e o término do processo de tradução respectivamente.

Primer	Sequência	Produto
Primer Forward	5' GGAATTCCATATGGGTGAATTACGGTTGG 3'*	500 pb
Primer Reverse	5' CCGCTCGAGTCATTACGGCACGCTATCCC 3'**	

\*Sítio para *NdeI* em destaque vermelho

\*\*Sítio para *XhoI* em destaque vermelho

A amplificação via PCR foi realizada em um termociclador PTC-100™ empregando-se um volume final de 25 µL constituído de 50 pmol de cada primer, 20ng de DNA genômico, 10mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase e 1,25 µL de DMSO. As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 36 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 min, hibridização a 56 °C por 1 min e extensão dos *primers* a 72 °C por 1 min; com extensão final a 72 °C por 9 min. Ao término da reação a mesma foi interrompida por resfriamento a 4 °C.

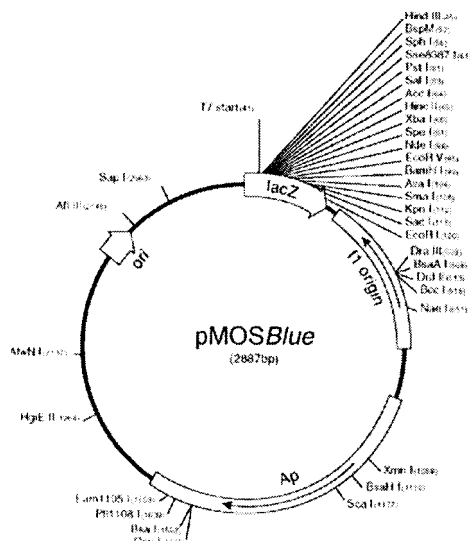
O produto da reação foi analisado aplicando-se 5 µL em gel de agarose a 1% contendo 0,5 µg mL<sup>-1</sup> de brometo de etídeo, em tampão 1X TBE (Tris-Borato-EDTA pH 8.0) e em seguida foi submetido a uma tensão de 100 V por 40 min. Em seguida, foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) ao término da eletroforese.

### 5.5 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO POR PCR

Uma vez conferido o tamanho correto do fragmento de DNA obtido, o produto de PCR restante (20 µL) foi separado novamente por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito anteriormente. O produto de PCR foi excisado e purificado utilizando-se o *Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. O resultado da extração foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

## 5.6 CLONAGEM DO FRAGMENTO PROVENIENTE DA EXTRAÇÃO DO GEL

O fragmento esperado obtido da extração do gel foi clonado no vetor pMOSBlue (Figura 5) utilizando-se o *Kit Blunt-ended PCR Cloning* (GE Healthcare). Neste *Kit*, o produto de PCR foi previamente fosforilado para então proceder a reação de ligação com o vetor linearizado e desfosforilado, também fornecido pelo *Kit*. Todas as etapas foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante.



**Figura 5.** Representação esquemática do vetor de clonagem pMOSBlue (GE Healthcare).

### 5.6.1 Meios de cultura

Para crescimento de *Escherichia coli* foi utilizado o meio de cultura Luria-Bertani (LB), composto de 1% (p/v) de bacto-triptona, 0,5% (p/v) de extrato de levedura, 1% (p/v) de NaCl, pH 7,5, acrescido de 0,005% (p/v) de ampicilina; 0,8% (p/v) de bacto-agar foi adicionado ao meio quando necessário.

### 5.6.2 Transformação de células de *Escherichia coli* competentes

Para a transformação, foram utilizados 200  $\mu$ L de células competentes, fornecidas pelo *Kit* mencionado anteriormente, e 1  $\mu$ L da reação de ligação. As células foram incubadas no gelo por 30 minutos, sendo, em seguida, submetidas a um choque térmico de 42°C por 40 segundos e novamente deixadas no gelo por 2 minutos. Foi adicionado 800  $\mu$ L de meio SOC e manteve-se a suspensão celular por 1 hora a 37°C no shaker (250 rpm).

Uma alíquota de 1  $\mu$ L das células foi plaqueada em placa de Petri contendo meio de cultura LB com o antibiótico ampicilina (concentração final de 50  $\mu$ g/mL), X-gal (1 mg/placa) e IPTG 100 mM (15  $\mu$ L/placa). As placas foram incubadas a 37°C por 20 horas. Vale salientar que o mesmo foi feito para os controles positivo (o pMOSBlue circular fornecido pelo Kit), controle negativo 1 (somente água) e controle negativo 2 (pMOSBlue linearizado mais água, da reação de ligação).

### 5.6.3 Avaliação da transformação

Para escolha dos clones recombinantes, o vetor de clonagem pMOSBlue possui dois parâmetros para seleção dos vetores que apresentam o fragmento desejado no sítio múltiplo de clonagem (SMC). O primeiro parâmetro é a seleção pela resistência ao antibiótico presente no meio de cultura, os clones que apresentam o plasmídeo internalizado serão selecionados, pois o mesmo confere resistência à ampicilina. O segundo parâmetro é a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, cujo gene está inserido no SMC, tendo X-gal como substrato. Se o fragmento desejado não for inserido no SMC, essa enzima será expressa normalmente através da indução com IPTG. Sendo assim, as colônias falso positivas terão uma coloração azul, devido a reação da enzima com o substrato, enquanto as que apresentam o plasmídeo recombinante serão brancas, pois o fragmento está inserido no SMC. Conseqüentemente, a enzima não será expressa.

## 5.7 MINI-PREP PARA PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

Para extração dos plasmídeos das colônias selecionadas, utilizou-se o *Kit GFX Micro Plasmid Prep* (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante.

### 5.7.1 Análise de restrição

Os plasmídeos obtidos da mini-prep foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI*. A reação foi realizada em um termociclador PTC-100<sup>TM</sup> empregando-se um volume final de 10  $\mu$ L constituído de 1  $\mu$ g do vetor recombinante e 5 U de *XhoI* e *NdeI*. A amostra foi mantida a 37°C por 18 horas e, posteriormente, observadas em gel de agarose 1%.

## 5.8 SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL DOS CLONES OBTIDOS

Os clones positivos foram enviados para sequenciamento (Sequenciador de DNA ABI PRISM) no Laboratório de Química de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Biomedicina de Valência, sob a coordenação do Prof. Dr. Juan J. Calvete. A reação de sequenciamento, foi realizada usando-se os procedimentos descritos no manual do *Kit ABI PRISM<sup>®</sup> Big Dye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*. Seguindo este protocolo, em tubos de 0,2 mL foram adicionados 2 µL de mix *Big Dye* (que contém dNTP, terminadores (ddNTPs) associados à substâncias fluorescentes e AmpliTaq DNA polymerase), 3 picomoles dos iniciadores, 10,5 v de água estéril, 6 µL de tampão Tris-HCl pH 9,0 contendo cloreto de magnésio e 0,5 µL de DNA plasmidial (200-500 ng). Após o sequenciamento, para verificar a integridade da seqüência obtida, esta foi submetida a uma busca em bancos de dados públicos como o NCBI através da ferramenta BLAST (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em 03/2004).

## 5.9 SUBCLONAGEM PARA O VETOR DE EXPRESSÃO

O plasmídeo pET-15-b (Novagen) utilizado como vetor de expressão neste estudo possui um gene que confere resistência a ampicilina e apresenta uma seqüência nucleotídica na região N-terminal do sítio múltiplo de clonagem que codifica seis histidinas denominada *His-tag*. Dessa forma, o gene *Rv1419* foi subclonado em fusão com esta seqüência facilitando a purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade em metal imobilizado. A realização da subclonagem foi feita seguindo as instruções do fabricante. Basicamente, o vetor pET15-b (Fig. 6) foi submetido a um tratamento enzimático com *XhoI* e *NdeI* a 37°C por 4 horas. Uma vez linearizado, o plasmídeo foi tratado com fosfatase alcalina a 37°C por 30 minutos e, em seguida, a reação de defosforilação foi inativada a 65°C por 15 minutos. Após esse procedimento foi feito um gel de agarose 1% para purificação do vetor pET15-b linearizado. Novamente o *Kit GFX DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) foi usado seguindo as recomendações do fabricante. O vetor purificado foi armazenado a -20°C até utilização.

O mesmo procedimento, exceto a etapa de defosforilação, foi realizado no vetor pMOSBlue para a preparação do inserto. Tendo o pET15-b e o inserto procedeu-se a reação de ligação, que foi avaliada posteriormente por um ensaio de restrição.





## 5.11 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.

A purificação da proteína recombinante envolveu a lise de bactérias. As células da cultura foram centrifugadas a 7000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) de bactérias foi mantido no gelo. Em seguida, usando uma pipeta sorológica de 10 mL, as células foram ressuspensas completamente adicionando-se 50 mL de solução de lise (Tampão Fosfato 1x, contendo imidazol 10 mM e uréia 8 M, pH 7,4) e então esse volume foi dividido em quatro tubos falcon de 50 mL que foram mantidos no gelo para sonificação (pulsos de 30 segundos (3x) com potência de 30 W). Após essa etapa, procedeu-se a centrifugação a 7000 rpm por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos cuidadosamente para um tubo falcon novo e estéril devidamente marcado. O *pellet* foi ressuspendido em solução de lise para solubilizar a proteína caso tenha sido expressa em corpos de inclusão, sendo que tanto o sobrenadante como o *pellet* foram avaliados quanto a expressão em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 %. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford e diluídas para a concentração de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> com a solução de lise antes de passar no HPLC (Sistema ÄKTA–Amersham). As amostras foram estocadas a -20°C ou passadas no filtro de 0,45 µm imediatamente antes da purificação no HPLC.

A estratégia empregada para a purificação da proteína recombinante contendo cauda de histidina utiliza as vantagens da cromatografia de afinidade em metal. Os íons metálicos são imobilizados através do uso de um agente quelante capaz de possibilitar a ligação da proteína ao metal. Alguns aminoácidos, principalmente a histidina, apresentam alta especificidade de ligação pelo metal imobilizado. Dessa maneira, proteínas ricas em histidinas podem ser especificamente eluídas da resina carregada com íons metálicos e então isoladas por este método.

### 5.11.1 Western-blot

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada aplicando-se 2 µg da proteína re-Rv1419p e 10 µg do CFP (Filtrado de cultura do bacilo) e WCL (Lisado total da micobactéria) no gel Bis-tris (4-12%, 1.0 mm) da Invitrogen. Após a transferência para a membrana de nitrocelulose, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com tampão de bloqueio (Tris-HCl pH 8.0 NaCl 150 mM contendo 5% de leite desnatado mólico) por 16 horas a 4 °C. Em seguida, a membrana foi incubada com soro policlonal produzido em coelho contra

a proteína re-Rv1419p, que foi diluído no tampão de bloqueio na proporção de 1:500 seguido de incubação por 3 horas a temperatura ambiente. Após lavagem da membrana, foi adicionado o anticorpo conjugado (*anti-rabbit alkaline phosphatase conjugate*) diluído no tampão de bloqueio na proporção de 1:5000 seguido de incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem da membrana, as bandas foram visualizadas adicionando-se o substrato para fosfatase alcalina, sendo a reação parada com água destilada.

## 5.12 ENSAIO DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A atividade hemaglutinante da re-Rv1419p foi testada frente a células sanguíneas de coelho, incubando-se diferentes concentrações da solução da proteína recombinante (2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) com igual volume de suspensão 2 % de eritrócitos de coelhos, tratados ou não tratados com enzimas proteolíticas (papaína e tripsina), em tubos de ensaio em triplicata. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min e deixadas a temperatura ambiente por 18 horas. A atividade hemaglutinante foi avaliada visualmente.

## 5.13 ENSAIOS COM MACRÓFAGOS DA LINHAGEM J774

Macrófagos da linhagem J774, gentilmente cedidos por Dra. Patrícia Veras, foram mantidos no nosso laboratório, posteriormente cultivados em meio RPMI 1640 completo e incubados a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO<sub>2</sub>. A troca de meio para estes macrófagos foi realizada a cada dois dias sendo mantidos até se iniciarem os experimentos.

### 5.13.1 Imunofluorescência

O cultivo de macrófagos J774 foi realizado em placas de 24 poços, contendo uma lamínula previamente autoclavada. Inicialmente, foram plaqueadas  $5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  por poço e incubadas por 16 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X (tampão fosfato-salina pH 7,2) sendo adicionado posteriormente meio RPMI 1640 completo. O experimento foi realizado incubando-se 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  da proteína recombinante re-Rv1419p a 4 °C por 15 min seguido de incubação a 37 °C por 15 min. As lamínulas foram novamente lavadas três vezes com PBS 1X sendo as células fixadas com paraformaldeído 4 % a 4 °C por 20 min. Após essa

etapa, as células foram permeabilizadas com PBS-Tween 2 % durante 30 min a 25 °C e lavadas uma vez com PBS-Tween 0.1 % por 5 min.

O bloqueio foi feito por 40 min com PBS-Tween 0.1 % contendo gelatina e 5 % de leite mólico. Logo em seguida, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 0.1 % por 5 min. O soro utilizado como anticorpo primário foi proveniente de um animal (coelho) submetido a um regime de três sensibilizações com intervalos de 15 dias (dose de 50 µg mL<sup>-1</sup> misturado com adjuvante incompleto de Freund), sendo que uma alíquota do soro foi retirada antes da primeira sensibilização e utilizada como controle do experimento. O anticorpo primário foi utilizado na diluição de 1:2500 tendo como diluente PBS-Tween 0.1 % contendo gelatina, seguido de incubação por 2 horas. Após esse período, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 0.1 % por 5 min e logo em seguida incubadas com anticorpo secundário *anti-rabbit* na diluição de 1:200 por 30 min. Novamente foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 0.1 % por 5 min. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com meio de montagem, analisadas e fotografadas no microscópio de fluorescência do CPqGM-FIOCRUZ.

### 5.13.2 Estimulação *in vitro* com a re-Rv1419p

O cultivo de macrófagos J774 foi realizado em placas de 24 poços. Inicialmente, foram plaqueadas 5x10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup> por poço e incubadas por 16 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os poços foram lavados uma vez com 1 mL de salina estéril para a retirada de células mortas, ou não aderentes, sendo adicionado meio RPMI 1640 completo. Previamente à adição dos estímulos, as células foram incubadas com Polimixina B 20 µg mL<sup>-1</sup> por 30 min a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO<sub>2</sub>. Os estímulos foram utilizados nas seguintes doses: LPS (500 ng mL<sup>-1</sup>); re-Rv1419p (1 µg mL<sup>-1</sup>; 5 µg mL<sup>-1</sup>; 10 µg mL<sup>-1</sup>); D-Galactose (0.1 M; incubada 30 min com a re-Rv1419p antes de adicionar na cultura). Os sobrenadantes foram coletados nos tempos de 6, 12 e 24 horas de cultura para dosagem de TNF por ELISA.

### 5.13.3 Detecção de citocinas pelo método de ELISA

A concentração de TNF presente no sobrenadante de cultura foi determinada pelo método imunoenzimático (ELISA). Basicamente, uma placa Maxi-Sort foi sensibilizada com 4 µg mL<sup>-1</sup> do anticorpo anti-TNF murino purificado (BD Biosciences) diluído no

tampão de corbetura (ver tampão), sendo adicionado 100  $\mu\text{L}$  por poço. A placa foi incubada por 16 horas a 4 °C. Em seguida, a solução de captura com o anticorpo foi removida e o bloqueio foi realizado adicionando-se 200  $\mu\text{L}$  por poço do tampão de bloqueio (PBS-Tween 0,05% contendo 1% de BSA). A placa foi vedada e incubada à temperatura ambiente por 2 horas. Após essa etapa, a placa foi lavada 5 vezes com PBS-Tween 0,05%.

TNF- $\alpha$  murino recombinante foi utilizado para gerar a curva padrão que teve como limite de detecção o valor de 800  $\text{pg mL}^{-1}$ . Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  por poço do padrão e amostras diluídos em tampão de bloqueio seguido de incubação por 3 horas e 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada novamente com PBS-Tween 0,05% e 100  $\mu\text{L}$  do segundo anticorpo biotilado (2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) diluído em tampão de bloqueio foi adicionado em cada poço, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Novamente, a placa foi lavada com PBS-Tween 0,05%. O anticorpo biotilado foi detectado por meio da utilização do conjugado-HRP (Avidin-Horseradish Peroxidase) que foi diluído em tampão de bloqueio na proporção de 1:2000, adicionando-se 100  $\mu\text{L}$  por poço seguido de incubação por 30 min à temperatura ambiente. A placa foi lavada com PBS-Tween 0,05%.

O substrato da reação foi preparado diluindo-se 1 mg de TMB (3,3',5,5'-*tetramethylbenzidine*) em 1 mL de DMSO. Após a diluição do TMB, foi adicionado 9 mL de tampão Fosfato-Citrato 0,05 M e 2  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio sendo imediatamente dispensado 100  $\mu\text{L}$  por poço seguido de incubação por 5 min à temperatura ambiente. Sendo observado que a curva ficou bem definida por meio do desenvolvimento da cor, a reação foi parada adicionando-se 50  $\mu\text{L}$  por poço de Ácido Sulfúrico 8 M seguido da leitura da densidade ótica a 450 nm.

#### 5.14 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Foram coletados cerca de 20 mL de sangue em tubo estéril heparinizado, dos pacientes e controles. O sangue diluído (1:2) com salina estéril foi depositado sobre um gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque) em um tubo Falcon de 50 mL, centrifugado a 1500 rpm por 20 min a 25 °C. A camada de células mononucleares, que possui o aspecto de uma nuvem branca e fica abaixo da camada de plasma e acima da de Ficoll, foi coletada cuidadosamente com um pipetador automático utilizando uma pipeta de 5 mL. As células mononucleares foram transferidas para um novo tubo sendo que a partir dessa etapa

todo o procedimento foi realizado a 4 °C. As células foram lavadas com salina estéril e centrifugadas a 1500 rpm por 10 min. O procedimento foi repetido mais duas vezes. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 completo, contadas e acertada a concentração para  $3 \times 10^6$  células por mL para o ensaio de re-estimulação *in vitro* e secreção de citocinas. A viabilidade celular foi realizada com o uso do Azul de Trypan.

#### 5.14.1 Cultura de células mononucleares do sangue periférico para re-estimulação *in vitro* e secreção de citocinas

As células foram cultivadas em placas de 48 poços em volume de 0,5 mL, contendo  $3 \times 10^6$  de CMSP por mL, em meio RPMI 1640 completo. Estas foram incubadas com Polimixina B  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  e mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5 % de CO<sub>2</sub> por 30 min previamente à adição dos estímulos. O filtrado de cultura do *M. tuberculosis* (CFP) foi utilizado como controle sendo obtido através de um contrato entre o Prof. Dr. André Báfica (UFSC-NIH) e a *Colorado State University (TB vaccine testing and research material)*. Brevemente, cada cepa foi crescida até o dia 14 de cultura (fase logarítmica) em meio GAS (*glycerol-alanine-salts*). O sobrenadante de cultura foi separado das células vivas pela passagem através de um filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ . O CFP foi concentrado por ultrafiltração usando uma membrana com ponto de corte de 5,000 Da. O material concentrado foi dialisado contra uma solução de bicarbonato de amônio 0.01 M, quantificado, aliqotado, liofilizado e finalmente armazenado a -80 °C. Esta preparação inclui a maioria das proteínas secretadas/excretadas pelo *M. tuberculosis*. As doses utilizadas de CFP e re-Rv1419p para a re-estimulação *in vitro* foram de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Após 48 horas de estímulo os sobrenadantes de cultura foram coletados para análise da secreção de citocinas por meio de CBA (*Cytokines Beads Assay BD Biosciences*) seguindo as recomendações do fabricante, avaliando principalmente a produção de TNF, IL-10 e IFN- $\gamma$ .

#### 5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados, quando comparados dois grupos, foram submetidos aos testes t de student ou Mann Whitney. Quando comparados três ou mais grupos, foram submetidos aos testes de variância ANOVA ou Kruskal Wallis

com pós-teste de Dunn. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0.05$ .

Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EUA).

## 6 RESULTADOS

---

### 6.1 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

O gene Rv1419 codifica para uma proteína hipotética de 157 aminoácidos que não apresenta ainda uma função conhecida. A proteína apresenta um domínio lectínico relacionado à cadeia B da ricina presente nos resíduos 33-153 como listado no Interpro. A análise utilizando o BLAST mostrou que esta proteína é similar a lectinas de *Viscum album*, *Abrus precatorius*, *Ricinus comunis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Clostridium acetobutylicum* etc. Entretanto, é oportuno ressaltar que a similaridade encontrada refere-se somente ao domínio de ligação a carboidratos, uma vez que as lectinas mencionadas apresentam mais de uma cadeia. Em plantas, por exemplo, o domínio de ricina frequentemente está associado a outro domínio sendo este de inativação de ribossomos. Em adição, o domínio de ricina pode estar presente em uma ou mais cópias podendo ligar açúcares simples como a galactose ou lactose. Com objetivo de caracterizar experimentalmente o gene Rv1419, oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificação e clonagem.

### 6.2 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM NO VETOR PMOSBLUE

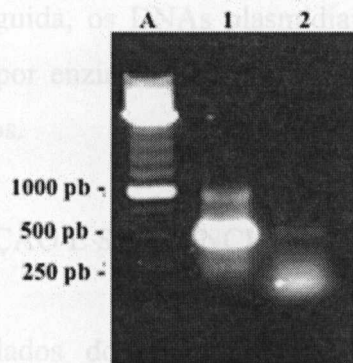
A cultura micobacteriana utilizada na extração do DNA genômico foi da bactéria *M. tuberculosis* H37Rv. Primeiramente, a concentração e a qualidade do DNA genômico obtido foi visualmente avaliada através da eletroforese em gel de agarose 0,8% e, posteriormente, confirmada através de leituras em espectrofotômetro ( $A_{260}/A_{280}$ ), como mencionado nos materiais e métodos. A metodologia utilizada segundo van Soolingen e colaboradores (VAN SOOLINGEN et al., 1991) permitiu a obtenção de um DNA de boa qualidade com rendimento de aproximadamente  $400 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , sendo suficiente para os experimentos seguintes.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram desenhados a partir da seqüência da ORF Rv1419 e tiveram sítios de restrição para as enzimas *NdeI* (*primer forward*) e *XhoI* (*primer reverse*) inseridos, mas preservando os códons originais de iniciação e terminação. A inserção destes sítios de restrição foi feita de forma a permitir sua subclonagem para o vetor de expressão pET-15b. Em adição, a temperatura de anelamento dos *primers* foi semelhante de forma a evitar a formação de estruturas indesejáveis como dímeros e



grampos que podem gerar auto-complementariedade, resultando na obtenção de subprodutos inespecíficos, como também comprometer a eficiência da reação de PCR do DNA de interesse. A temperatura ótima de amplificação ficou em torno dos 56 °C. Nesta temperatura uma banda inespecífica de cerca de 1000 pb esteve presente, o que pode ser atribuído a prováveis excessos de dNTPs e eventuais subprodutos na reação de amplificação.

A Figura 7 ilustra o resultado desta amplificação a qual gerou também o produto de 500 pares de bases. Este produto de amplificação teve o seu tamanho concordante com o previsto, apesar de apresentar uma banda inespecífica como mencionado anteriormente. Entretanto, a PCR resultou em quantidades suficientes para o procedimento de clonagem, não comprometendo a mesma uma vez que o produto foi excisado do gel.



**Figura 7.** Amplificação da ORF codificadora da proteína hipotética Rv1419p. A coluna A é o padrão de massa molecular de 250 pb DNA Ladder da Invitrogen. A coluna 1 é a ORF *Rv1419* amplificada. A coluna 2 representa o controle negativo da reação de PCR. O meio de separação foi gel de agarose 1 % em tampão 1X TBE, pH 8,0. A voltagem aplicada durante a separação foi 100 V por 40 min. Os fragmentos de DNA no gel foram visualizados em transiluminador UV.

O produto de 500 pares de bases da amplificação por PCR foi adequadamente purificado pelo *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* da GE Healthcare, quantificado visualmente no gel e fosforilado para inseri-lo no vetor de clonagem pMOSBlue. A concentração obtida para este produto foi aproximadamente de 200ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . A construção no vetor de clonagem foi denominada de pMOSBlue-Mtb. Este sistema foi escolhido para propagação do plasmídeo baseado no fato de que o vetor é muito conveniente para clonar produtos de PCR assim como na seleção dos clones positivos. O vetor apresenta 2887 pb e contém dois marcadores de seleção ao longo de sua seqüência, um gene que confere resistência à ampicilina e outro gene que codifica para a proteína  $\beta$ -

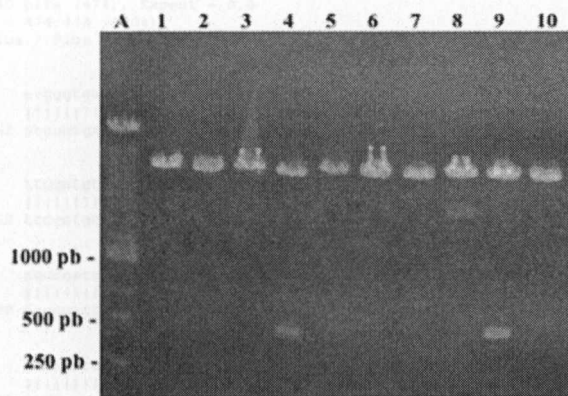
galactosidase localizado no sítio de múltipla clonagem. O plasmídeo recombinante pMOS*Blue*-Mtb construído foi inserido por choque térmico em bactérias *E. coli* competentes fornecidas pelo *kit*. As bactérias transformadas foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB, agar, X-gal, IPTG e ampicilina e crescidas por 16 horas em estufa por incubação a 37 °C.

Colônias azuis e brancas cresceram na placa contendo o meio utilizado como descrito acima. A seleção das colônias recombinantes foi realizada então pela capacidade de crescer na presença de ampicilina e pela coloração branca de algumas colônias brancas transformadas, indicando a presença do inserto na região codificadora da enzima  $\beta$ -galactosidase. Dentre as colônias brancas resistentes, duas foram escolhidas aleatoriamente, inoculadas em tubos estéreis contendo meio LB líquido com ampicilina e incubadas por 16 horas a 37 °C sob agitação. O mesmo procedimento foi realizado com oito colônias azuis. Em seguida, os DNAs plasmidiais destas colônias foram extraídos, quantificados e analisados por enzimas de restrição para checar a presença do inserto e, posteriormente, seqüenciados.

### 6.3 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO E SEQÜENCIAMENTO

Os plasmídeos isolados dos dois prováveis clones recombinantes positivos, extraídos pelo *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, foram considerados de boa qualidade para as análises de restrição e seqüenciamento, uma vez que na verificação da integridade do DNA em gel de agarose e na quantificação em espectrofotômetro para avaliar os níveis de contaminação protéica não houve problemas. As concentrações obtidas foram de aproximadamente 200 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

O ensaio de restrição envolvendo as enzimas *NdeI* e *XhoI* foi realizado para confirmar a presença do inserto nos clones selecionados. Nesta análise, o tamanho do inserto foi analisado pela clivagem do plasmídeo em sítios de restrição que são adjacentes ao sítio de clonagem, sendo posteriormente avaliados por eletroforese em gel de agarose. A figura 8 apresenta o perfil de restrição dos 10 clones selecionados, sendo dois prováveis clones positivos e oito prováveis clones negativos.



**Figura 8.** Eletroforese dos plasmídeos digeridos pMOSBlue-Mtb. A coluna A é o padrão de massa molecular 1kb Plus DNA Ladder da Invitrogen. As colunas 4 e 9 são os clones positivos selecionados a serem utilizados na subclonagem para o vetor de expressão. O meio de separação foi gel de agarose 1% em tampão 1X TBE, pH 8,0. A voltagem aplicada durante a separação foi 100 V por 30 min. Os fragmentos de DNA foram visualizados em transiluminador UV.

A presença e o tamanho dos insertos confirmaram as etapas de clonagem e transformação de bactérias. Os produtos da digestão de 500 pb referente a ORF Rv1419 foram cortados do gel, purificados novamente com o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, quantificados e utilizados no procedimento de subclonagem no vetor de expressão. Estas amostras apresentaram concentrações de 120 a 150 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . As seqüências resultantes do seqüenciamento foram então submetidas a um processo de busca por similaridade em bancos de dados internacionais. O programa utilizado para a busca foi o software público BLAST, cujos resultados mostraram uma similaridade de seqüência de 100 % de identidade frente à seqüência nucleotídica correspondente a ORF deste estudo, confirmando a presença do inserto e que não houve inserções errôneas de bases nucleotídicas durante a amplificação da ORF Rv1419 a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis*.

A figura 9 ilustra a seqüência resultante de um dos clones submetidos a um processo de busca por similaridade em banco de dados.

Após o período de incubação, sete colônias foram selecionadas aleatoriamente e analisadas seguindo o mesmo procedimento descrito previamente. As amostras de DNAs plasmidiais extraídas foram submetidas a uma clivagem por enzimas de restrição. A Figura 10 ilustra o perfil de restrição destes 7 clones selecionados.

```

Score = 940 bits (474), Expect = 0.0
Identities = 474/474 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1      atgggtgaattacggttggtaggggggtgtgctccgggtcccttctcctggtegggtccggtg 60
             |||
Sbjct: 210462  atgggtgaattacggttggtaggggggtgtgctccgggtcccttctcctggtegggtccggtg 210521

Query: 61      ttccgatgtgggggtgctaaacggcgggtggggctagtgcgcagcggccgggtccagctgaag 120
             |||
Sbjct: 210522  ttccgatgtgggggtgctaaacggcgggtggggctagtgcgcagcggccgggtccagctgaag 210581

Query: 121     agccgattggggatgctttgcttggagcggcccgagtgggagctgggttcagcccgctgggtg 180
             |||
Sbjct: 210542  agccgattggggatgctttgcttggagcggcccgagtgggagctgggttcagcccgctgggtg 210641

Query: 181     atcaaacccctgcaatgggacggactttcagcggctgggaatctcaaccgatcaaccggcaggtg 240
             |||
Sbjct: 210642  atcaaacccctgcaatgggacggactttcagcggctgggaatctcaaccgatcaaccggcaggtg 210701

Query: 241     gaaagcgtggcctcccccggggaatggctgaatctcgggaatgctttgtggcgcggcctg 300
             |||
Sbjct: 210702  gaaagcgtggcctcccccggggaatggctgaatctcgggaatgctttgtggcgcggcctg 210761

Query: 301     cagccctgtgtgaactggatcagccagcactggactgtccagcccgacggcctgggtcaag 360
             |||
Sbjct: 210762  cagccctgtgtgaactggatcagccagcactggactgtccagcccgacggcctgggtcaag 210821

Query: 361     agtgatcttqatgactgactcaccggtctccggcgggtccggatcctgggacctgggtgccc 420
             |||
Sbjct: 210822  agtgatcttqatgactgactcaccggtctccggcgggtccggatcctgggacctgggtgccc 210881

Query: 421     acccgtgggtgggaccccgaatgcaccggaccacacagtgggatagcgtgcccgtaa 474
             |||
Sbjct: 210882  acccgtgggtgggaccccgaatgcaccggaccacacagtgggatagcgtgcccgtaa 210933

```

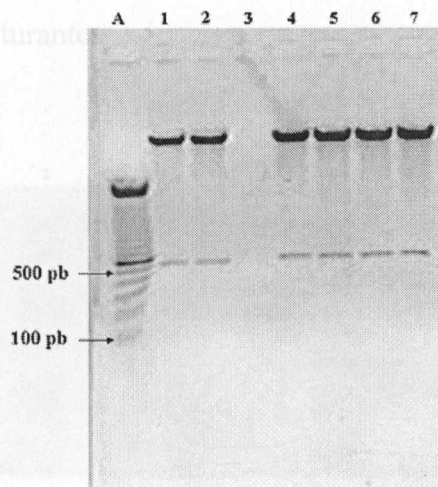
**Figura 9.** Bases seqüenciadas do plasmídeo pMOSBluc-Mtb extraído dos dois clones positivos. As bases correspondem a ORF Rv1419 que codifica para proteína Rv1419p.

## 6.4 SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO E ANÁLISE DE RESTRIÇÃO

O inserto de 500 pb que codifica para a proteína Rv1419p foi subclonado no vetor pET-15b. Esta nova construção foi denominada de pET-15b-Mtb e escolhida para expressar a proteína de interesse fusionada com uma cauda de seis histidinas. Novamente, os plasmídeos recombinantes construídos foram inseridos em bactérias *E. coli* DH5α competentes por choque térmico, semeadas em placas, e posteriormente incubadas para crescimento. A seleção de colônias foi realizada somente pela análise de restrição, uma vez que o vetor pET-15b não apresenta genes que os tornem diferentes pela coloração.

Após o período de incubação, sete colônias foram selecionadas aleatoriamente e inoculadas seguindo o mesmo procedimento descrito previamente. As amostras de DNAs plasmidiais extraídas foram submetidas a uma clivagem por enzimas de restrição. A Figura 10 ilustra o perfil de restrição destes 7 clones selecionados.

A Figura 10 representa um gel SDS-PAGE a 12% obtido após as simulações submetidas a condições desnaturantes.



**Figura 10.** Separação dos plasmídeos digeridos pET-15b-Mtb. A coluna A é o padrão de massa molecular DNA Ladder da Invitrogen. As colunas de 1 a 2 e de 4 a 7 são os clones positivos, sendo a coluna 3 um contaminante. O meio de separação foi gel de agarose 0,8 % em tampão 1X TBE, pH 8,0. A voltagem aplicada durante a separação foi de 100 V por 40 min. Os plasmídeos digeridos e os insertos de 500 pb foram visualizados em transiluminador UV.

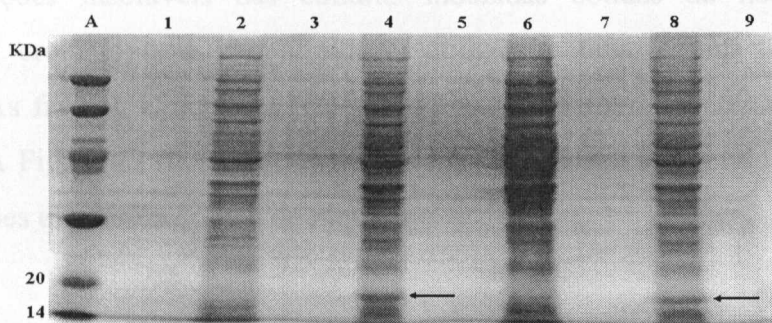
Uma vez confirmada a presença do inserto nos clones selecionados, um clone foi selecionado aleatoriamente, já que todos apresentaram a mesma intensidade de bandas, e utilizado para transformar células de expressão *E. coli* BL21(DE3) competentes. A seleção do novo clone contendo a ORF Rv1419 subclonada no vetor de expressão foi realizada após plaqueamento das células em meio apropriado sendo este clone empregado na produção da proteína recombinante.

## 6.5 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA RV1419P A PARTIR DO VETOR DE EXPRESSÃO

A produção da proteína Rv1419p na forma recombinante foi realizada por meio da indução da expressão por IPTG a 37 °C sob agitação. Com o objetivo de otimizar o tempo de expressão protéica, alíquotas foram retiradas de hora em hora para a quantificação da expressão de modo a obter quantidades adequadas da proteína recombinante a serem utilizadas nas etapas subsequentes. Os extratos de proteínas foram avaliados quanto a sua solubilidade por eletroforese SDS-PAGE nos diferentes tempos e após o período de indução de 4 horas, as células foram recuperadas por centrifugação e lisadas na presença do tampão de lise (conforme descrito em materiais e métodos).



6.6 A Figura 11 representa um gel SDS-PAGE a 12% obtido após as amostras serem submetidas a condições desnaturantes.



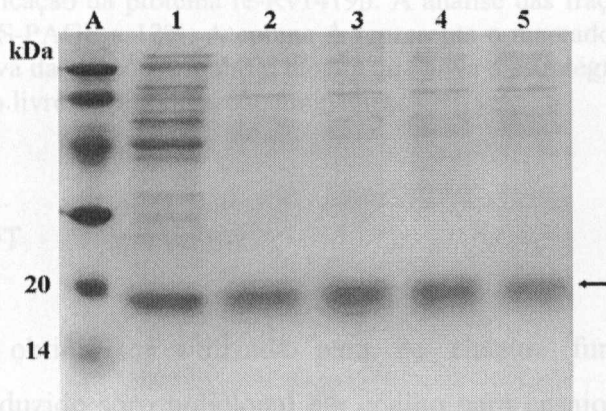
**Figura 11.** Expressão da proteína Rv1419p. A análise foi realizada em SDS-PAGE a 12 %. A coluna A representa o padrão de massa molecular. As colunas 1 e 2 representam o tempo 0 hora após indução sendo o sobrenadante de cultura e lisado total, respectivamente; as colunas 3 e 4 representam a fração induzida após uma hora de cultura, com uma seta indicando a banda de interesse; as colunas 5 e 6 representam a fração não induzida após uma hora de cultura; as colunas 7 e 8 representam a fração induzida após duas horas de cultura.

A presença de uma banda diferenciada nas frações induzidas 3, 4, 7 e 8 apresenta o tamanho esperado para a proteína Rv1419p, cerca de 16 kDa, mostrando o sucesso no protocolo de expressão adotado, uma vez que foi observado expressão da proteína de interesse já no tempo de uma hora após indução. Quando analisado qualitativamente os níveis de expressão, não houve diferenças nos tempos analisados sendo observado o mesmo perfil até 5 horas após a indução. Em adição, após a lise celular foi evidenciado por meio de SDS-PAGE que a proteína esteve presente em grande quantidade na fração insolúvel ou expressa na forma de corpos de inclusão no sistema de expressão utilizado. Por outro lado, não foi constatada a presença da proteína de interesse na fração solúvel do citoplasma e no sobrenadante de cultura.

Apesar de a proteína ter sido expressa na forma insolúvel, não houve problemas na produção em maior escala em *E. coli* seguindo o mesmo protocolo de expressão, cuja quantidade obtida foi adequada para as etapas de purificação quanto para os estudos funcionais.

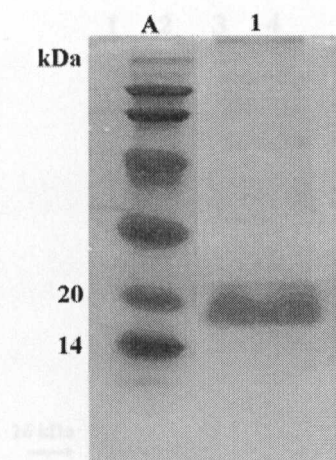
## 6.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RE-RV1419P POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

As frações insolúveis das culturas induzidas obtidas da lise celular foram submetidas à cromatografia de afinidade utilizando uma coluna contendo níquel imobilizado. As frações eluídas durante o processo cromatográfico foram analisadas por SDS-PAGE. A Figura 12 mostra a separação por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 % das frações eluídas da coluna de níquel.



**Figura 12.** Purificação da re-Rv1419p por cromatografia de afinidade. A análise das frações eluídas da coluna de níquel foi feita em SDS-PAGE a 12 %. A coluna A é marcador de massa molecular. As colunas de 1 a 5 compreendem as frações de lavagem com imidazol 500 mM correspondentes ao pico de eluição. A proteína re-Rv1419p está indicada pela seta.

Algumas das purificações realizadas inicialmente neste estudo apresentaram proteínas contaminantes nas frações eluídas, como pode ser observado na figura 12. Para otimizar o processo de purificação em resina de afinidade e, conseqüentemente, eliminar a presença de contaminantes, a estratégia utilizada foi obter as frações eluídas através de um gradiente de imidazol de 0 a 500 mM. Dessa forma, em concentrações menores de imidazol, as proteínas contaminantes são eluídas primeiro. O emprego desta estratégia possibilitou a purificação da proteína recombinante re-Rv1419p em um único passo cromatográfico. A pureza foi confirmada pelas frações eluídas com o tampão de lise contendo diferentes concentrações de imidazol nas quais apresentaram uma banda de cerca de 16 kDa em condições desnaturantes. A Figura 13 representa um gel SDS-PAGE a 12% obtido após as amostras serem submetidas a eluição com gradiente de imidazol.



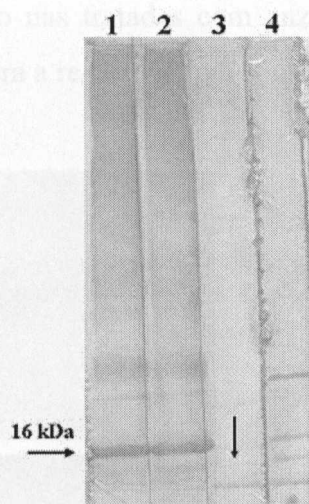
**Figura 13.** Nova purificação da proteína re-Rv1419p. A análise das frações eluídas da coluna de níquel foi feita em SDS-PAGE a 12%. A coluna A representa o marcador de massa molecular. A coluna 1 é representativa das frações eluídas e mostra que nova a estratégia utilizada na purificação resultou em uma fração livre de proteínas contaminantes.

## 6.7 WESTERN-BLOT

Através da análise das bandas do *Western-blot*, pode-se notar que a preparação da proteína re-Rv1419p foi realizada de forma eficiente. Esta fração obtida foi utilizada para os ensaios funcionais subseqüentes. Inicialmente, foi produzido soro policlonal em coelho para ensaios de imunolocalização. Em um destes ensaios, a presença de moléculas relacionadas imunologicamente à proteína de interesse foi avaliada por *western-blot* em frações do *M. tuberculosis*. As frações utilizadas foram o filtrado de cultura do bacilo (CFP), fração que apresenta a maioria das proteínas excretadas/secretadas do *M. tuberculosis*, e o lisado total da micobactéria (WCL). Em adição, com o objetivo de avaliar a homogeneidade da preparação da proteína recombinante, a fração utilizada em todos os experimentos deste estudo também foi avaliada. A Figura 14 ilustra um *western-blot* das frações utilizadas neste estudo.

A hemaglutinação de eritrócitos de coelho foi dependente do tempo e efetiva, uma vez que após 16 horas de incubação foi possível observar a presença da atividade. Além disso, a menor concentração da proteína recombinante ( $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi capaz de aglutinar hemácias tratadas enzimaticamente na mesma proporção que na dose de  $10$  ou  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Entretanto, o mesmo não foi observado em hemácias normais em que a dose de  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  promoveu uma hemaglutinação discreta quando comparada com as outras doses. As doses de  $5$ ,  $10$  e  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  não apresentaram diferenças na atividade hemaglutinante tanto





**Figura 14.** *Western-blot* para a proteína re-Rv1419p e para frações protéicas do *M. tuberculosis*. O *Western-blot* foi realizado com soro de coelho proveniente de sensibilizações com a proteína re-Rv1419p. As colunas 1 e 2 representam alíquotas da re-Rv1419p (2 µg) de uma mesma fração. A coluna 3 representa o filtrado de cultura do bacilo (10 µg) e a coluna 4 o lisado total da micobactéria (10 µg).

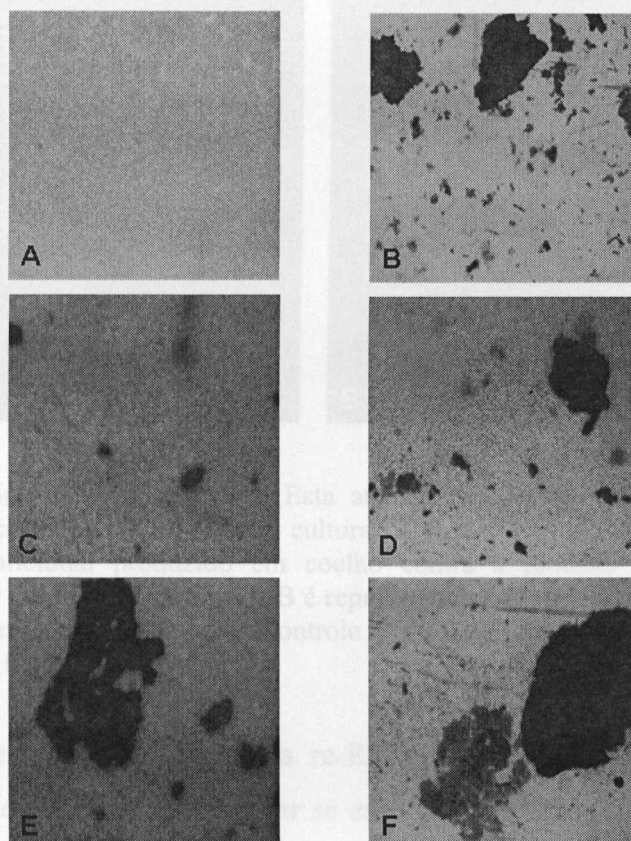
Através da análise das bandas do *Western-blot*, pode-se notar que a preparação da proteína recombinante mostrou-se relativamente homogênea. Além disso, nota-se também a presença de uma banda discreta (indicada pela seta) de aproximadamente 13 kDa, que seria a massa molecular esperada da proteína sem o peptídeo sinal, na fração do filtrado de cultura. Três bandas também foram reconhecidas no lisado total da micobactéria.

## 6.8 ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A habilidade da re-Rv1419p para aglutinar células foi avaliada frente a hemácias de coelhos. O teste de hemaglutinação foi empregado para checar se a proteína possui atividade biológica ou lectínica.

A hemaglutinação de eritrócitos de coelho foi dependente do tempo e efetiva, uma vez que após 16 horas de incubação foi possível observar a presença de atividade. Além disso, a menor concentração da proteína recombinante ( $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi capaz de aglutinar hemácias tratadas enzimaticamente na mesma proporção que na dose de 10 ou  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Entretanto, o mesmo não foi observado em hemácias normais em que a dose de  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  promoveu uma hemaglutinação discreta quando comparada com as outras doses. As doses de 5, 10 e  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  não apresentaram diferenças na atividade hemaglutinante tanto

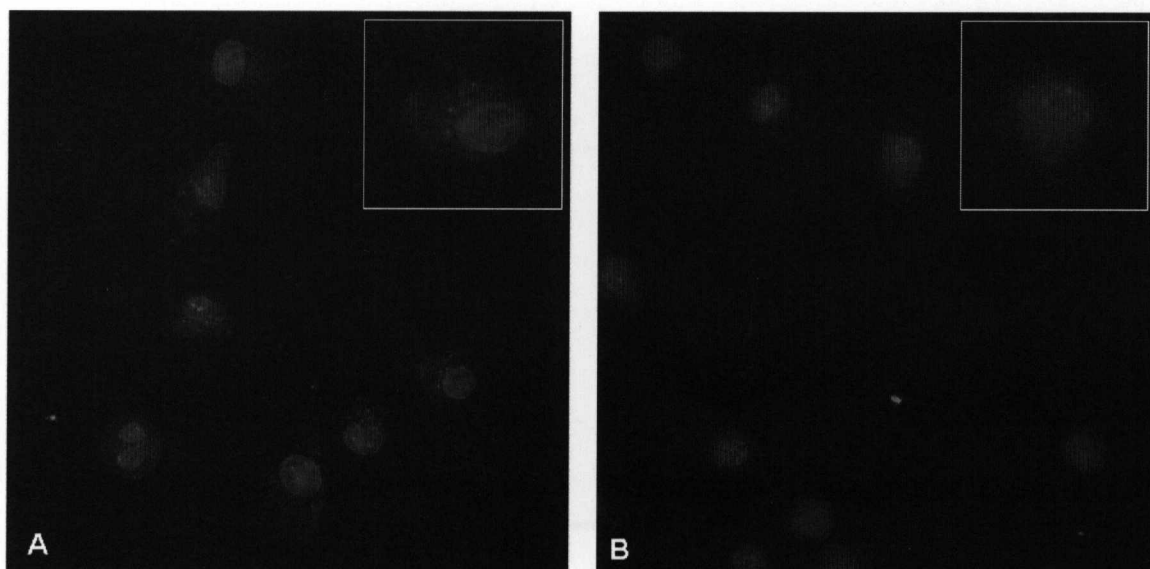
em hemácias normais como nas tratadas com enzimas. A Figura 15 mostra o perfil de atividade hemaglutinante para a re-Rv1419p e controles.



**Figura 15.** Ensaio de hemaglutinação da re-Rv1419p. Utilizaram-se diferentes concentrações da proteína recombinante para simples checagem frente a suspensão de 2% de eritrócitos de coelho. A figura 15A é o controle negativo; a figura 15B é o controle positivo feito com uma lectina de leguminosa; as figuras 15C e 15D representam as doses de 2,5 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, na condição de hemácias normais; as figuras 15E e 15F representam as doses de 2,5 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, na condição de hemácias tratadas.

## 6.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A análise de imunofluorescência foi utilizada para a avaliação da interação da proteína re-Rv1419p com células J774 em cultura. Os experimentos demonstraram marcação na superfície celular apresentando uma distribuição heterogênea a julgar pela intensidade do sinal observado quando comparado com o controle com soro pré-imune, cuja intensidade do sinal era bastante inferior, sugerindo especificidade para o sinal observado. A Figura 16 ilustra a localização celular da proteína re-Rv1419p em células J774.

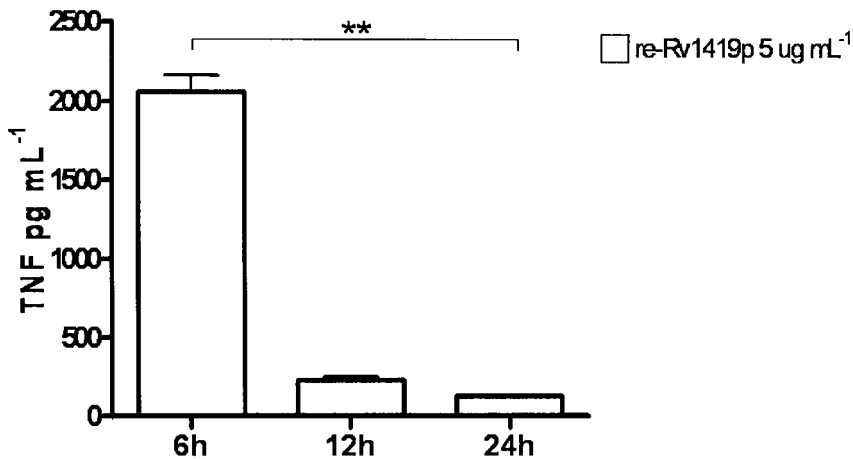


**Figura 16.** Análise por imunofluorescência. Esta análise revelou que a proteína re-Rv1419p interage com a superfície de células J774 em cultura. A figura 16A é representativa do ensaio realizado com soro policlonal produzido em coelho contra a proteína recombinante, sendo observada a presença de marcação. A figura 16B é representativa do mesmo ensaio sendo utilizado um soro pré-imune do mesmo animal como controle. As fotos foram tiradas no microscópio de fluorescência (objetiva 100x).

Uma vez observado que a proteína re-Rv1419p interage com células J774 em cultura, procedeu-se aos ensaios para avaliar se essa interação teria um papel na ativação destas células por meio da dosagem de TNF no sobrenadante de cultura.

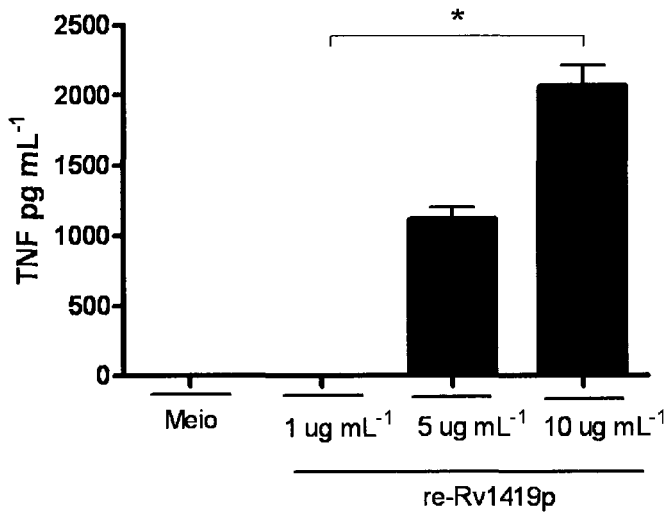
#### 6. 10 ESTIMULAÇÃO *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS J774

O papel da proteína re-Rv1419p na estimulação da secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos J774 foi avaliado *in vitro*. Estas células quando estimuladas com a proteína recombinante na dose de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram capazes de secretar TNF- $\alpha$  de forma dependente do tempo, sendo que no tempo de 6 horas a produção foi maior quando comparada com os tempos de 12 e 24 horas. A secreção de TNF- $\alpha$  induzida por LPS permaneceu estável nos tempos avaliados. A Figura 17 representa a produção de TNF- $\alpha$  em diferentes tempos.



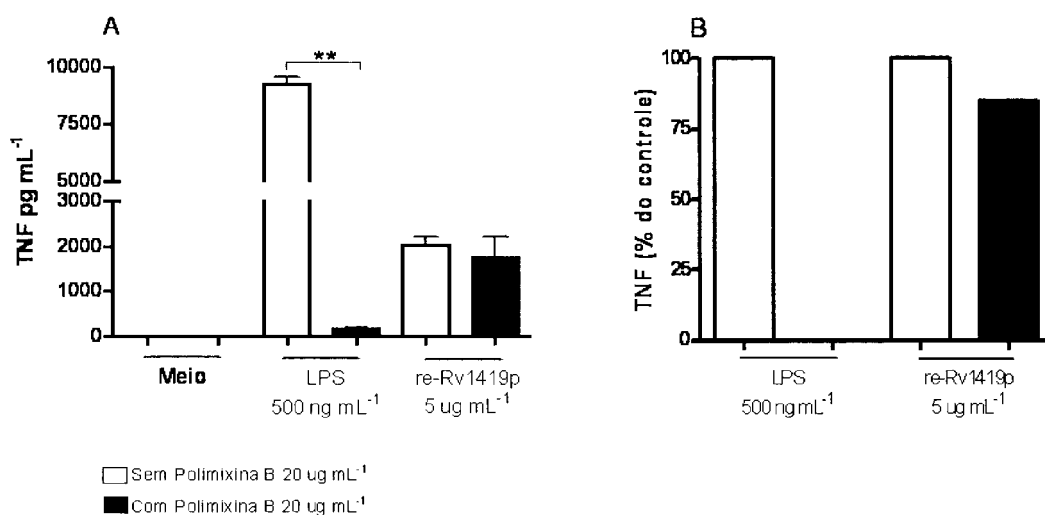
**Figura 17.** Secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos J774 no sobrenadante de cultura. Os sobrenadantes foram coletados nos tempos de 6, 12 e 24 horas e a dosagem de TNF- $\alpha$  foi realizada por meio de ELISA. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. As dosagens foram realizadas em triplicata para cada condição. Os resultados representam uma média de duas dosagens independentes. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, (\*\* $p < 0.01$ ).

Uma vez que o TNF- $\alpha$  foi produzido no tempo de 6 horas após adição do estímulo na cultura, foi avaliado se essa produção seria dependente da dose da proteína recombinante. Como ilustrado na Figura 18, a produção de TNF- $\alpha$  foi dependente da dose no tempo de 6 horas, sendo que na dose de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  não foi observado a produção dessa citocina.



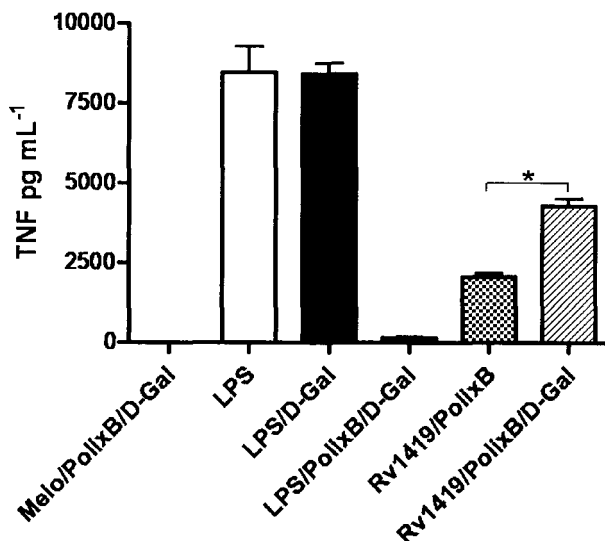
**Figura 18.** Secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos J774 no sobrenadante de cultura. Os sobrenadantes foram coletados no tempo de 6 horas e a dosagem de TNF- $\alpha$  foi realizada por meio de ELISA. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. As dosagens foram realizadas em triplicata para cada condição. Os resultados representam uma média de duas dosagens independentes. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, (\* $p < 0,05$ ).

Os ensaios envolvendo a estimulação *in vitro* de macrófagos J774 avaliaram também a presença de endotoxina (LPS), comumente presente em preparações de proteínas recombinantes em *E. coli*. Este ensaio foi realizado na presença e ausência de polimixina B, sendo observado que, na presença de polimixina B, houve inibição completa da produção de TNF- $\alpha$  induzida por LPS. Por outro lado, foi observado inibição parcial da produção de TNF- $\alpha$  quando a proteína re-Rv1419p foi utilizada como estímulo. A Figura 19 representa o ensaio realizado mostrando que cerca de 80% do TNF- $\alpha$  produzido não pode ser atribuído ao LPS contaminante na estimulação com a re-Rv1419p. A porcentagem foi calculada baseada na média dos valores em picogramas do controle sem polimixina B (100%).



**Figura 19.** Secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos J774 no sobrenadante de cultura. Os sobrenadantes foram coletados no tempo de 6 horas e a dosagem de TNF- $\alpha$  foi realizada por meio de ELISA. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. As dosagens foram realizadas em triplicata para cada condição. Os resultados representam uma média de duas dosagens independentes. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Mann Whitney, (\*\* $p < 0.01$ ).

A produção de TNF- $\alpha$ , em macrófagos J774, induzida pela proteína re-Rv1419p foi dependente do tempo e da dose. Para avaliar se o domínio lectínico teria uma participação na produção de TNF- $\alpha$ , o mesmo ensaio, anteriormente mencionado, foi realizado na presença do açúcar simples D-Galactose. Ao contrário do que se esperava, a adição da D-Galactose à re-Rv1419p levou a que a produção de TNF- $\alpha$  tivesse um aumento de cerca de duas vezes ( $p < 0.05$ ). A Figura 20 representa a produção de TNF- $\alpha$  na presença da D-Galactose.

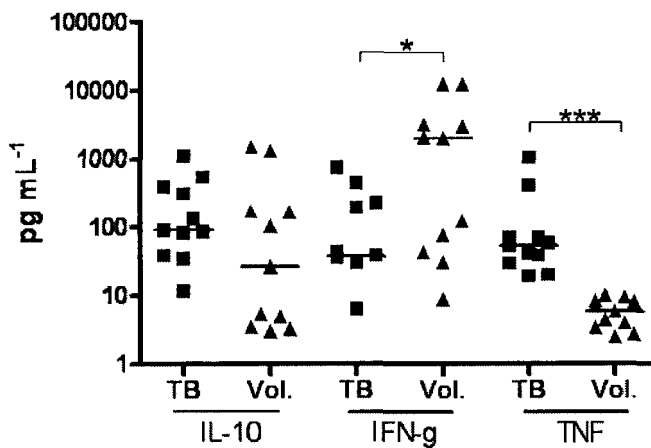


**Figura 20.** Secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos J774 no sobrenadante de cultura. Os sobrenadantes foram coletados no tempo de 6 horas e a dosagem de TNF- $\alpha$  foi realizada por meio de ELISA. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. As dosagens foram realizadas em triplicata para cada condição. Os resultados representam uma média de duas dosagens independentes. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Mann Whitney (\* $p < 0.05$ ).

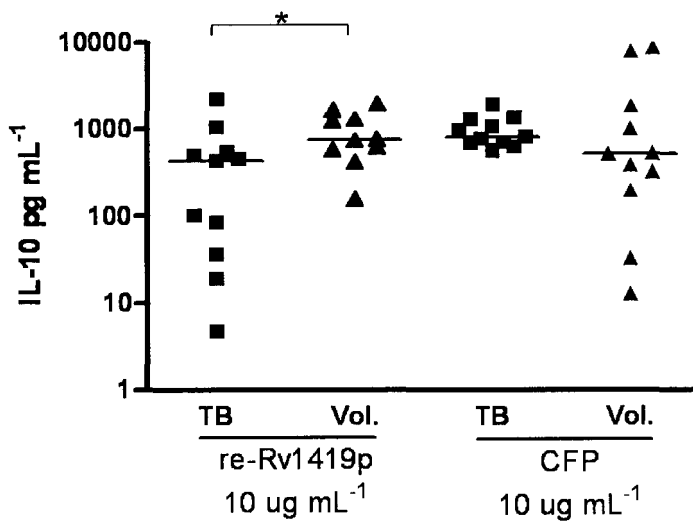
## 6.11 ESTIMULAÇÃO IN VITRO DE CMSP HUMANAS

Tendo em vista a importância das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 na patogenia da tuberculose, a produção das mesmas foi avaliada em resposta aos antígenos CFP e re-Rv1419p nos dois grupos em estudo (pacientes e doadores saudáveis) utilizando a metodologia do CBA (*Cytokines Beads Assay*).

A produção de IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foi avaliada na ausência de estimulação antigênica, sendo observado uma produção estatisticamente significativa de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em doadores saudáveis e pacientes, respectivamente (Figura 21). Avaliando-se a produção de IL-10 após estímulo com os antígenos mencionados anteriormente, foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos estimulados (pacientes e doadores saudáveis) com a re-Rv1419p sendo que o mesmo não foi visto para os grupos estimulados com CFP. Em adição, não houve diferenças significativas quando o mesmo grupo foi comparado em relação aos antígenos utilizados como pode ser observado na Figura 22.



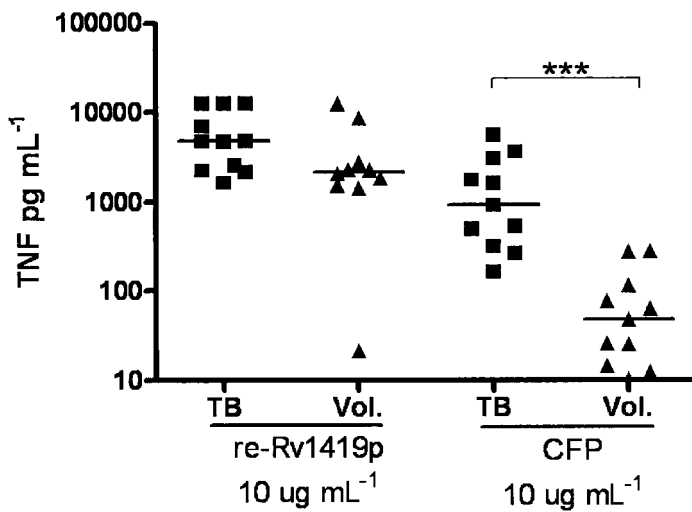
**Figura 21.** Produção basal de IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos grupos TB (■, n=11) e Vol. (▲, n=11). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 48 horas de estímulo e o método de CBA foi utilizado para a dosagem de citocinas. A barra representa a mediana dos valores. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Mann Whitney (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).



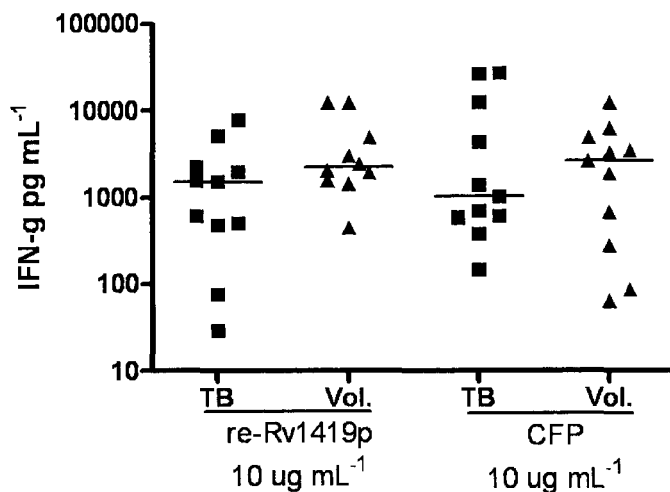
**Figura 22.** Produção de IL-10 frente aos antígenos re-Rv1419p e CFP nos grupos TB (■, n=11) e Vol. (▲, n=11). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 48 horas de estímulo e o método de CBA foi utilizado para a dosagem de IL-10. A barra representa a mediana dos valores. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Mann Whitney (\* $p < 0.05$ ).



Em adição, tanto CFP como a re-Rv1419p induziram a secreção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por CMSP de pacientes com tuberculose e doadores saudáveis, sendo observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos (pacientes e doadores saudáveis) quando CFP foi utilizado como estímulo na produção de TNF- $\alpha$  (Figura 23). A avaliação da produção de IFN- $\gamma$  revelou uma tendência à diminuição de resposta no grupo dos pacientes com tuberculose quando comparado com o grupo de doadores saudáveis. Em relação às medianas de produção desta citocina, não houve diferenças significativas entre os grupos que foram estimulados com CFP ou re-Rv1419p (Figura 24).



**Figura 23.** Produção de TNF- $\alpha$  frente aos antígenos re-Rv1419p e CFP nos grupos TB (■, n=11) e Vol. (▲, n=11). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 48 horas de estímulo e o método de CBA foi utilizado para a dosagem de TNF- $\alpha$ . A barra representa a mediana dos valores. Asterisco indica diferença significativa calculado pelo teste não-paramétrico Mann Whitney (\*\*\*)  $p < 0.001$ .



**Figura 24.** Produção de IFN- $\gamma$  frente aos antígenos re-Rv1419p e CFP nos grupos TB (■, n=11) e Vol. (▲, n=11). Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 48 horas de estímulo e o método de CBA foi utilizado para a dosagem de IFN- $\gamma$ . A barra representa a mediana dos valores. Não houve diferença estatística entre os grupos analisados.

## 7 DISCUSSÃO

---

Neste trabalho objetivamos estudar uma proteína hipotética do *M. tuberculosis* codificada pelo gene *Rv1419*, o que foi possibilitado pelo seqüenciamento do genoma do *M. tuberculosis* (COLE et al., 1998). A abordagem *in silico*, baseada na construção de um banco de dados de seqüências não redundantes de lectinas e a utilização do mesmo na mineração de dados genômicos do *M. tuberculosis*, foi possível identificar uma provável nova lectina. Esta proteína apresentou, por análise bioinformática, uma seqüência sinal na região N-terminal sendo que o resto da seqüência apresentou um domínio de ligação a carboidratos ou lectínico. A metodologia utilizada pode ser validada uma vez que dois trabalhos independentes utilizando metodologias similares identificaram a mesma seqüência de proteína como tendo relação estrutural com lectinas (SINGH et al., 2007; GOMEZ et al., 2000). Dessa forma, a análise computacional de dados biológicos tornou-se importante para a identificação de seqüências relacionadas às lectinas considerando que as mesmas podem estar envolvidas nos eventos iniciais de infecção e adesão de bactérias patogênicas. É oportuno ressaltar que a bioinformática fornece evidências que são passíveis de serem testadas experimentalmente.

Em adição aos esforços no desenvolvimento de ferramentas de bioinformática para a caracterização de proteínas novas de bactérias de interesse médico ou biotecnológico, a expressão heteróloga de proteínas permitiu uma abordagem importante que vem revolucionando os estudos de estrutura, função, purificação e identificação de novas proteínas. Isso é particularmente interessante no caso do *M. tuberculosis* uma vez que esta bactéria possui o crescimento lento e exige um nível 3 de biossegurança para se trabalhar, o que tornaria o processo de isolamento de proteínas nativas complicado e laborioso.

O sistema mais amplamente utilizado para expressão de proteínas heterólogas é o que utiliza *E. coli* como célula hospedeira. Este sistema é bastante difundido devido à facilidade e baixo custo de se cultivar esta bactéria e pela reprodutibilidade e abundância de proteínas que a mesma produz. Entretanto, a expressão de algumas proteínas de micobactérias em *E. coli* tem que ser avaliada com cuidado, uma vez que, para apresentarem atividade biológica ou mesmo gerarem uma resposta imunológica, estas precisam sofrer um tipo de processamento pós-traducional específico que as proteínas expressas em *E. coli* as vezes não sofrem. De fato, segundo Temmerman e colaboradores (2004) a HBHA (*heparin-binding hemagglutinin*) de *M. tuberculosis* necessita sofrer um processo de metilação para promover altos níveis de proteção em camundongos desafiados

com *M. tuberculosis*, enquanto que a proteína não metilada não confere proteção. Nessas situações, o *M. smegmatis* é utilizado como hospedeiro para expressão de proteínas de *M. tuberculosis*, uma vez que aquela micobactéria possui uma maquinaria de processamento de proteínas similar ou conservada. Por outro lado, a maioria dos vetores existentes para expressão em micobactérias são constitutivos ou não indutíveis, dificultando o processo de expressão e limitando a quantidade de proteína recombinante para ensaios funcionais. No presente estudo, optamos por não utilizar o hospedeiro micobacteriano devido às limitações mencionadas anteriormente para os ensaios funcionais previstos e também porque a proteína Rv1419p não apresenta, por análise bioinformática, sítios de modificação pós-traducionais preditos. De maneira ideal, quando se pensa em expressão de proteínas recombinantes, espera-se que a proteína seja estável, não tóxica para a bactéria, solúvel, expressa em grande quantidade e possa ser facilmente purificada. No nosso caso, a expressão da proteína re-Rv1419 foi observada uma hora após indução com IPTG na fração insolúvel do citoplasma, ou seja, houve formação de corpos de inclusão, o que pode significar que a proteína foi produzida em grandes quantidades.

Um problema que pode surgir na formação de corpos de inclusão tem relação com a estrutura nativa da proteína e, conseqüentemente, com sua atividade biológica. De fato, o procedimento realizado para purificação de uma proteína recombinante dos corpos de inclusão é a sua solubilização em condições desnaturantes, o que pode comprometer a re-solubilização da proteína após purificação e dessa maneira torná-la inativa. Apesar da proteína re-Rv1419p ter sido expressa na forma de corpos de inclusão, não encontramos dificuldades nos procedimentos de re-solubilização, uma vez que a mesma apresentou-se totalmente solúvel. Considerando que a expressão de proteínas heterólogas provenientes da manipulação de genes alvos representa a última etapa da importante tecnologia do DNA recombinante, o subseqüente estudo desta proteína pode fornecer evidências sobre o seu papel na interação entre o *M. tuberculosis* e as células do hospedeiro.

Neste trabalho, observamos que a proteína re-Rv1419p apresentou atividade biológica ou hemaglutinante frente a eritrócitos de coelhos, caracterizando-a dessa forma como uma lectina. Este resultado, além de mostrar que a proteína recombinante preservou sua atividade biológica ou sua estrutura nativa, foi uma demonstração formal de que a hipótese levantada pela bioinformática sobre o domínio lectínico era verdadeira, o que evidencia a importância desta ferramenta na caracterização de novas proteínas. Apesar disso, erros de anotação podem ocorrer (JOHNSTON et al., 2003), mostrando que ensaios experimentais devem ser feitos em paralelo às análises de bioinformática. Em adição, os

resultados de imunofluorescência sugerem que a proteína recombinante interage com a superfície celular de macrófagos J774 sendo que nesse sistema utilizado não houve evidências de endocitose, uma vez que o sinal observado apresentou uma distribuição heterogênea. Em adição, o resultado do *western blot* sugere que a proteína re-Rv1419p pode ser tanto secretada pelo bacilo como estar associada à membrana. Isto está de acordo com um trabalho em colaboração com o Dr. André Báfica MIP-UFSC (dados não mostrados) em que soro de animais imunizados com DNA para o gene Rv1419 e soro de animais infectados com *M. tuberculosis* reconhecem uma banda de aproximadamente 13 kDa (massa molecular esperada para a proteína sem o peptídeo sinal).

Nesse aspecto, as interações específicas entre patógenos e hospedeiros constituem um requisito para a virulência, sendo que proteínas extracelulares e de superfície celular são fundamentais na participação de tais interações. De fato, um dos aspectos comuns compartilhados por diferentes bactérias patogênicas é o envolvimento da secreção/exportação de proteínas nos mecanismos de virulência. Os diferentes fatores de virulência (toxinas, adesinas, invasinas, lípases, proteases etc.) claramente revelam o significativo impacto que proteínas associadas à superfície celular e secretadas possuem na patogênese de bactérias (FINLAY & FALKOW, 1997). Algumas proteínas secretadas e exportadas do *M. tuberculosis* são consideradas fatores de virulência, podendo estar envolvidas na internalização da bactéria ou na sobrevivência no interior de macrófagos. As proteínas que fazem parte do complexo antígeno 85 são encontradas tanto na parede celular como no filtrado de cultura (BELISLE et al., 1997). De forma similar, FAP-A, uma proteína secretada de ancoragem à fibronectina do *Mycobacterium avium*, apresenta um sítio único de ligação à fibronectina que se postula ter um papel principal na ancoragem da bactéria nas células do hospedeiro (ZHAO et al., 1999). Em adição, as proteínas secretadas pelo *M. tuberculosis* podem modular a resposta de macrófagos. Esta hipótese é suportada pelas observações de que a infecção de macrófagos com células vivas de *M. tuberculosis* inibe a acidificação dos fagossomos e maturação, sendo que estes eventos não são observados quando células mortas do *M. tuberculosis* são utilizadas (CLEMENS & HORWITZ, 1995). Entretanto, estas observações não excluem a possibilidade de que proteínas secretadas/exportadas do *M. tuberculosis* podem estar modulando a função de macrófagos antes mesmo de ocorrer a infecção ou internalização da bactéria (TRAJKOVIC et al., 2004).

Ao avaliarmos a resposta de macrófagos J774 frente a proteína re-Rv1419p, observamos que esta teve um efeito pró-inflamatório, uma vez que houve a indução da

produção de TNF- $\alpha$ . Esta produção não se pode atribuir à contaminação por LPS, considerando que a contaminação de proteínas recombinantes clonadas em *E. coli* com endotoxinas (LPS) representa um problema sério na pesquisa de funções biológicas de proteínas. No nosso estudo, avaliamos a capacidade da Polimixina B em neutralizar o LPS como contaminante através da redução da produção de TNF- $\alpha$  *in vitro*. Polimixina B é um antibiótico utilizado para prevenir choque séptico (GERARD et al., 1993) sendo também usado para inibir a ação do LPS na produção de TNF- $\alpha$  *in vitro* (VAN DER KLEIJ et al., 2004). Dessa forma, observamos que 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi suficiente para inibir completamente a produção de TNF- $\alpha$  induzida por 500  $\text{ng mL}^{-1}$  de LPS, o que fortalece a hipótese de que a produção observada não se deve à contaminação por LPS. Em adição, observamos que esta produção foi maior no tempo de 6 horas diminuindo após 12 horas e 24 horas. Por outro lado, a produção de TNF- $\alpha$  por LPS foi similar nos tempos analisados, não decaindo com o tempo. Essa diferença pode ser explicada pela produção de IL-10, apesar de não ter sido avaliada neste sistema *in vitro*, que é induzida em resposta ao TNF- $\alpha$ , podendo modular sua produção (GERARD et al., 1993; MARCHANT et al., 1994). Outra observação interessante é que houve um aumento na produção de TNF- $\alpha$  na presença do açúcar simples D-Galactose, o que poderia significar que o domínio lectínico teria pouco ou nenhum envolvimento nessa produção. Entretanto, a D-Galactose poderia entrar no sítio de ligação da proteína promovendo uma mudança estrutural que, por sua vez, teria um efeito sinérgico refletido na melhora da atividade biológica observada. Isso teria que ser confirmado por dados cristalográficos para verificar se ocorre de fato uma mudança na estrutura quaternária da proteína na presença do açúcar, o que poderia ter implicações importantes nos estudos de patogênese molecular da tuberculose.

Com o objetivo de caracterizar o perfil de citocinas de pacientes com tuberculose pulmonar e de indivíduos saudáveis, nós estudamos a secreção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de ambos os grupos doadores na presença e ausência de antígenos complexos (CFP) e antígeno simples (re-Rv1419p). Na ausência de estimulação antigênica, níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 foram secretados por CMSP de ambos os grupos. Entretanto, somente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram secretados em concentrações significantes por CMSP de doadores saudáveis e pacientes com tuberculose, respectivamente. Estes resultados diferem de achados prévios, que demonstraram que, na ausência de antígenos micobacterianos, CMSP de pacientes e indivíduos saudáveis secretam níveis similares de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , sendo que os primeiros secretam, de forma significativa, concentrações elevadas de IL-10 (DEMISSIE et al., 2004;

AL-ATTIYAH et al., 2006). A secreção de IFN- $\gamma$  em indivíduos sadios está associada a uma resposta protetora do tipo I que é necessária para controlar a infecção (GONG et al., 1996). A diferença observada pode ser devido a diferenças metodológicas, uma vez que o ponto de análise do nosso estudo foi de 48 horas, enquanto que as análises dos trabalhos citados foram feitas após 5-6 dias de cultura. Escolhemos o ponto de 48 horas, pois, em um estudo piloto, observamos por FACS que as células dos pacientes apresentavam granulosidade alta após 72 horas de estimulação antigênica (dados não mostrados), indicando apoptose.

Nós observamos posteriormente que, na presença de antígenos de *M. tuberculosis* (CFP), citocinas associadas a proteção, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , foram secretadas por CMSP humanas. Estes resultados indicam que o estado imunológico dos pacientes com tuberculose não está comprometido, mostrando que as células são capazes de produzir citocinas após re-estimulação *in vitro*. A secreção de IFN- $\gamma$  por CMSP de indivíduos sadios pode ocorrer devido a alguns motivos, incluindo a vacinação com BCG, exposição à micobactérias atípicas, ou ambientais, e infecção com *M. tuberculosis* (AL-ATTIYAH et al., 2003). Estes resultados suportam a hipótese de que antígenos protetores podem ser encontrados na fração do filtrado de cultura do bacilo (ANDERSEN, 1994). Em adição, o mesmo padrão foi observado para essas citocinas quando o antígeno utilizado foi a re-Rv1419p, sendo que este antígeno induziu concentrações maiores de TNF- $\alpha$  ( $p < 0.01$ ) em pacientes com tuberculose quando comparado ao CFP.

Alguns trabalhos demonstraram que o IFN- $\gamma$ , citocina que ativa macrófagos e que é produzida por células T, é crucial na proteção contra *M. tuberculosis* (SPELLBERG et al., 2001; DORMAN & HOLLAND, 2000). A maioria das pessoas infectadas com *M. tuberculosis* são PPD+ e apresentam uma resposta imune apropriada contra a infecção. Nesses indivíduos, há uma produção elevada de IFN- $\gamma$  por CMSP em resposta à bactéria, sendo que eles não desenvolvem doença ativa, indicando que a resposta imune celular é capaz de controlar a infecção (SAMTEN et al., 2000). Entretanto, a redução na produção de IFN- $\gamma$  por CMSP está associada à severidade da doença, o que confirmaria o papel da resposta imune celular na proteção contra a tuberculose (GONG et al., 1996). Apesar de não haver diferença estatística entre o grupos em estudo para ambos os estímulos com relação a produção de IFN- $\gamma$ , no grupo dos doadores saudáveis há uma tendência a uma maior produção de IFN- $\gamma$  em relação aos pacientes, o que poderia ser confirmado posteriormente com o aumento do número de doadores no estudo.

Em adição à ativação das funções microbidas induzidas em macrófagos pelo IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$  apresenta um papel co-estimulatório nessa ativação. De fato, o bloqueio da produção endógena de TNF- $\alpha$  reduz a ativação de macrófagos induzida por IFN- $\gamma$ , sendo que a combinação das duas citocinas induz uma ativação ótima (FLESCH & KAUFMANN, 1993). Além disso, foi demonstrado que a neutralização do TNF- $\alpha$  em camundongos com tuberculose latente resultou na reativação da doença (MOHAN et al., 2001), o que evidencia que esta citocina está envolvida na formação de lesões granulomatosas e no controle da disseminação da bactéria. Por outro lado, altos níveis de TNF- $\alpha$  podem estar relacionados com manifestações sistêmicas que ocorrem comumente em pacientes com tuberculose, podendo nesse caso ter um efeito deletério associado à doença (CADRANEL et al., 1990).

Ao avaliarmos a produção de IL-10, citocina associada a um padrão de resposta do tipo II, CMSP de indivíduos sadios secretaram IL-10 em resposta aos antígenos CFP e re-Rv1419p. Este antígeno induziu concentrações maiores de IL-10 ( $p < 0.05$ ) em comparação aos pacientes, sendo que não observamos diferenças quando CFP foi utilizado como estímulo. É amplamente aceito que a IL-10 apresenta um papel na regulação da resposta protetora do tipo I (TURNER et al., 2002) e que antígenos selecionados para o desenho de vacinas contra a tuberculose não devem induzir a secreção de IL-10. Por outro lado, a produção de IL-10 é importante para evitar uma resposta imune exagerada do hospedeiro, o que pode gerar uma inflamação descontrolada e, dessa forma, favorecer a disseminação da infecção.

Neste estudo, nós mostramos que níveis detectáveis de ambos os tipos de citocinas, citocinas Th1 e IL-10, são secretadas por CMSP de pacientes com tuberculose em resposta a antígenos complexos (CFP). Em adição, os resultados mostraram que a proteína re-Rv1419 também induz a secreção de citocinas protetoras assim como de IL-10. Além disso, a proteína re-Rv1419 é uma lectina o que pode fornecer subsídios para ensaios estruturais e funcionais a respeito do papel desta proteína nos eventos de infecção e invasão do *M. tuberculosis*.



## 8 CONCLUSÃO

---

- O produto codificado pelo gene Rv1419 de função hipotética ou desconhecida apresentou atividade hemaglutinante, o que confirmou os dados de bioinformática sobre a presença de um domínio lectínico.
- Os dados de imunofluorescência sugerem que a proteína recombinante interage com macrófagos J774.
- A produção de TNF observada por células J774 pode ser atribuída à proteína recombinante. Tal produção é dependente do tempo e da dose, mas não é dependente do domínio lectínico.
- A proteína recombinante parece estimular um componente pro-inflamatório em CMSP humanas, com aumento da produção de TNF e IFN e redução de IL-10.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AL-ATTIYAH, R.; MADI, N.; EL-SHAMY, A. S.; WIKER, H.; ANDERSEN, P.; MUSTAFA, A. Cytokine profiles in tuberculosis patients and healthy subjects in response to complex and single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 254-261, 2006.

AL-ATTIYAH, R.; MUSTAFA A. S.; ABAL A. T.; EL-SHAMY A. S.; DALEMANS W.; SKEIKY, Y. A. In vitro cellular immune responses to complex and newly defined recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 138, p. 139-44, 2004.

AL-ATTIYAH, R.; MUSTAFA, A. S.; ABAL, A. T.; MADI, N. M.; ANDERSEN, P. Restoration of mycobacterial antigen-induced proliferation and interferon-gamma responses in peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients upon effective chemotherapy. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 38, p. 249-256, 2003.

ANDERSEN, P. The T cell response to secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunobiology**, v. 191, p. 537-547, 1994.

APWEILER, R. et al. InterPro-An integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. **Bioinformatics**, v. 16, p. 1145-1150, 2000.

ARRUDA, S.; BOMFIM, G.; KNIGHTS, R.; HUIMA-BYRON, T.; RILEY, L. W. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. **Science**, v. 261, p. 1454-1457, 1993.

ATTWOOD, T. K.; et al. PRINTS and PRINTS-S shed light on protein ancestry. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 239-241, 2002.

BAFICA, A.; SCANGA, C. A.; SCHITO, M.; CHAUSSABEL, D.; SHER A. Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors. **J. Immunol.**, v. 172, p. 7229-7234, 2004.

BAFICA, A.; SCANGA, C. A.; SCHITO, M. L.; HIENY, S.; SHER, A. Cutting edge: in vivo induction of integrated HIV-1 expression by mycobacteria is critically dependent on Toll-like receptor 2. **J. Immunol.**, v. 171, p. 1123-1127, 2003.

BAIROCH, A.; APWEILER, R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. **Nucleic Acids Res.**, v. 28 p. 45-48, 2002.

BATEMAN, A. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 276-280, 2002.

BELISLE, J. T.; VISSA, V. D.; SIEVERT, T.; TAKAYAMA, K.; BRENNAN, P. J.; BESRA, G. S. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. **Science**, v. 276, p. 1420-1422, 1997.

BENSON, D. A.; et al. GenBank. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p.17-20, 2002.

BIRNEY, E.; DURBIN, R. Dynamite: a flexible code generating language for dynamic programming methods used in sequence comparison. **Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.**, v. 5, p. 56-64, 1997.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, p. 1453-1474, 1997.

BORGDORFF, M. W.; NAGELKERKE, N. J.; DYE, C.; NUNN, P. Gender and tuberculosis: a comparison of prevalence surveys with notification data to explore sex differences in case detection. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 4, p. 123-132, 2000.

BURGE, C.; KARLIN, S. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. **J. Mol. Biol.**, v. 268, p. 78-94, 1997.

CADRANEL, J.; PHILIPPE, C.; PEREZ, J.; MILLERON, B.; AKOUN, G.; ARDAILLOU, R.; BAUD, L. In vitro production of tumour necrosis factor and prostaglandin E2 by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 81, p. 319-324, 1990.

CHITALE, S.; EHRT, S.; KAWAMURA, I.; FUJIMURA, T.; SHIMONO, N.; ANAND, N.; LU, S.; COHEN-GOULD, L.; RILEY, L. W. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. **Cell Microbiol.**, v. 3, p. 247-254, 2001.

CHOI, K. H.; KREMER, L.; BESRA, G. S.; ROCK, C. O. Identification and substrate specificity of beta -ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 28201-28207, 2000.

CLEMENS, D. L.; HORWITZ, M. A. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 257-270, 1995.

COLE, S. T.; BROSCH, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; 3<sup>rd</sup>; 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.; BARRELL, B. G. & et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537-544, 1998.

COLE, S. T.; BROSCH, R.; PARKHILL, J.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; WHEELER, P. R.; HONORE, N.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R. M.; DEVLIN, K.; DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HOENSBY, T.; JAGELS, K.; LACROIX, C.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K. M.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.;

WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J. R.; BARREL, B. G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007-1011, 2001.

COLLINS, D. M. In search of tuberculosis virulence genes. **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 426-430, 1996.

COLLINS, K.R.; QUIÑONES-MATEU, M. E.; TOOSSI, Z.; ARTS, E. J. Impact of tuberculosis on HIV-1 replication, diversity, and disease progression. **AIDS Rev.**, v. 4, p. 165-176, 2002.

CORBETT, E. L.; STEKETEE, R. W.; TER KUILE, F. O.; LATIF, A. S.; KAMALI, A.; HAYES, R. J. HIV-1/AIDS and the control of other infectious diseases in Africa. **Lancet**, v. 359, p. 2177-2187, 2002.

CORPET, F.; et al. ProDom and ProDom-CG: tools for protein domain analysis and whole genome comparisons. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 267-269, 2000.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respir. Med.**, v. 100, p. 1862-1870, 2006.

DE NORONHA, A. L.; BÁFICA, A.; NOGUEIRA, L.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; Lung granulomas from Mycobacterium tuberculosis/HIV-1 co-infected patients display decreased in situ TNF production. **Pathol. Res. Pract.**, v. 204, p. 155-161, 2008.

DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G.; DE VRIES, J. E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 1209-1220, 1991.

DEL AMO, J.; MALIN, A. S.; POZNIAK, A.; DE COCK, K. M. Does tuberculosis accelerate the progression of HIV disease? Evidence from basic science and epidemiology. **Aids**, v. 13, p. 1151-1158, 1999.

DEMISSIE, A.; ABEBE, M.; ASEFFA, A.; ROOK, G.; FLETCHER, H.; ZUMLA, A.; WELDINGH, K.; BROCK, I.; ANDERSEN, P.; DOHERTY, T. M. Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4delta2. **J. Immunol.**, v. 172, p. 6938-6943, 2004.

DERETIC, V.; PAGÁN-RAMOS, E.; ZHANG, Y.; DHANDAYUTHAPANI, S.; VIA, L. E. The extreme sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to the front-line antituberculosis drug isoniazid. **Nat. Biotechnol.**, v. 14, p. 1557-1561, 1996.

DONOGHUE, H. D.; SPIGELMAN, M.; GREENBLATT, C. L.; LEV-MAOR, G.; BAR-GAL, G. K.; MATHESON, C.; VERNON, K.; NERLICH, A. G.; ZINK, A. R. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, p. 584-592, 2004.

DORMAN, S. E.; HOLLAND, S. M. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 11, p. 321-333, 2000.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Palaeomicrobiology: current issues and perspectives. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p.23-35, 2005.

DYE, C.; ESPINAL, M. A.; WATT, C. J.; MBIAGA, C.; WILLIAMS, B. G. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 1197-1202, 2002.

DYE, C.; WATT, C. J.; BLEED, D. M.; MEHRAN HOSSEINI, S.; RAVIGLIONE, M. C. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. **JAMA**, v. 293, p. 2767-2775, 2005.

ELLNER, J. J. Review: the immune response in human tuberculosis--implications for tuberculosis control. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. 1351-1359, 1997.

ESPITIA C, LACLETTE JP, MONDRAGÓN-PALOMINO M, AMADOR A, CAMPUZANO J, MARTENS A, SINGH M, CICERO R, ZHANG Y, MORENO C. The PE-PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a new family of fibronectin-binding proteins? **Microbiology**, v. 145, p. 3487-3495, 1999.

FALQUET, L.; et al. The PROSITE database, its status in 2002. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 235-238, 2002.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, p. 136-169, 1997.

FIorentino, D. F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; MOORE, K. W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3444-3451, 1991.

FLEISCHMANN, R. D.; ALLAND, D.; EISEN, J. A.; CARPENTER, L.; WHITE, O.; PETERSON, J.; DEBOY, R.; DODSON, R.; GWINN, M.; HAFT, D.; HICKEY, E.; KOLONAY, J. F.; NELSON, W. C.; Umayam, L. A.; ERMOLAEVA, M.; SALZBERG, S. L.; DELCHER, A.; UTTERBACK, T.; WEIDMAN, J.; KHOURI, H.; GILL, J.; MIKULA, A.; BISHAI, W.; JACOBS JR W. R.; VENTER, J. C.; FRASER, C. M. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 5479-5490, 2002.

FLESCH, I. E.; KAUFMANN, S. H. Role of cytokines in tuberculosis. **Immunobiology**, v. 189, p. 316-339, 1993.

FLESSELLES, B.; ANAND, N. N.; REMANI J, LOOSMORE SM, KLEIN MH. Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 177, p. 237-242, 1999.

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J. C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; DUTHOY, S.; GRONDIN, S.; LACROIX, C.; MONSEMPE, C.; SIMON, S.; HARRIS, B.; ATKIN, R.; DOGGETT, J.; MAYES, R.; KEATING, L.; WHEELER,

P. R.; PARKHILL, J.; BARRELL, B. G.; COLE, S. T.; GORDON, S. V.; HEWINSON, R. G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 100, p. 7877-7882, 2003.

GÉRARD, C.; BRUYNS, C.; MARCHANT, A.; ABRAMOWICZ, D.; VANDENABEELE, P.; DELVAUX, A.; FIERS, W.; GOLDMAN, M.; VELU, T. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 547-550, 1993.

GIRARD, M. P.; FRUTH, U.; KIENY, M. P. A review of vaccine research and development: tuberculosis. **Vaccine**, v. 23, p. 5725-5731, 2005.

GLICKMAN, M. S.; JACOBS, W. R. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. **Cell**, v. 104, p. 477-485, 2001.

GOMEZ, M.; JOHNSON, S.; GENNARO, M. L. Identification of secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by a bioinformatic approach. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2323-2327, 2000.

GONG, J. H.; ZHANG, M.; MODLIN, R. L.; LINSLEY, P. S.; IYER, D.; LIN, Y.; BARNES, P. F. Interleukin-10 downregulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 913-918, 1996.

GORDON, S. V.; HEYM, B.; PARKHILL, J.; BARRELL, B.; COLE, S. T. New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Microbiology**, v. 145, p. 881-892, 1999.

GOULDING, C. W.; APOSTOL, M.; ANDERSON, D. H.; GILL, H. S.; SMITH, C. V.; KUO, M. R.; YANG, J. K.; WALDO, G. S.; SUH, S. W.; CHAUHAN, R.; KALE, A.; BACHHAWAT, N.; MANDE, S. C.; JOHNSTON, J. M.; LOTT, J. S.; BAKER, E. N.; ARCUS, V. L.; LEYS, D.; MCLEAN, K. J.; MUNRO, A. W.; BERENDZEN, J.; SHARMA, V.; PARK, M. S.; EISENBERG, D.; SACCHETTINI, J.; ALBER, T.; RUPP, B.; JACOBS JR W.; TERWILLIGER, T. C. The TB structural genomics



consortium: providing a structural foundation for drug discovery. **Curr. Drug Targets Infect. Disord.**, v. 2, p. 121-141, 2002.

GRANGE, J. M. The biology of the genus *Mycobacterium*. **Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.**, v. 25, p. 1S-9S, 1996.

GUTIERREZ, M. C.; BRISSE, S.; BROSCHE, R.; FABRE, M.; OMAÏS, B.; MARMIESSE, M.; SUPPLY, P.; VINCENT, V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathog.**, v. 1, p. e5, 2005.

HENIKOFF, S.; et al. Blocks+: a non-redundant database of protein alignment blocks derived from multiple compilations. **Bioinformatics**, v. 15, p. 471-479, 1999.

HEYM, B.; ALZARI, P. M.; HONORÉ, N.; COLE, S. T. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol. Microbiol.**, v. 15, p. 235-245, 1995.

HEYM, B.; STAVROPOULOS, E.; HONORÉ, N.; DOMENECH, P.; SAINT-JOANIS, B.; WILSON, T. M.; COLLINS, D. M.; COLSTON, M. J.; COLE, S. T. Effects of overexpression of the alkyl hydroperoxide reductase *AhpC* on the virulence and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1395-1401, 1997; **Immunobiology**, v. 191, p. 537-547, 1994.

JACOBSON, R. L.; DOYLE, R. J. Lectin-parasite interactions. **Parasitol. Today**, v. 12, p. 55-61, 1996.

JARLIER, W.; NIKAIIDO, H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 123, p. 11-18, 1994.

JOHNSTON, J. M.; ARCUS, V. L.; MORTON, C. J.; PARKER, M. W.; BAKER, E. N. Crystal structure of a putative methyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*: misannotation of a genome clarified by protein structural analysis. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 4057-4065, 2003.

JUNGBLUT, P. R.; MÜLLER, E. C.; MATTOW, J.; KAUFMANN, S. H. Proteomics reveals open reading frames in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv not predicted by genomics. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 5905-5907, 2001.

KWON, H. H.; TOMIOKA, H.; SAITO, H. Distribution and characterization of beta-lactamases of mycobacteria and related organisms. **Tuber. Lung Dis.**, v. 76, p. 141-148, 1995.

LAURENCE, J., **In AIDS and other manifestations of HIV infection**. 2 ed. Raven Press, 1992. p. 77-83.

LEE, R. E.; BRENNAN, P. J.; BESRA, G. S. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 215, p. 1-27, 1996.

LOCHT, C.; HOUGARDY, J. M.; ROUANET, C.; PLACE, S.; MASCART, F. Heparin-binding hemagglutinin, from an extrapulmonary dissemination factor to a powerful diagnostic and protective antigen against tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, p. 303-309, 2006.

MARCHANT, A.; BRUYNS, C.; VANDENABEELE, P.; DUCARME, M.; GÉRARD, C.; DELVAUX, A.; DE GROOTE, D.; ABRAMOWICZ, D.; VELU, T.; GOLDMAN, M. Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, p. 1167-1171, 1994.

MITCHELL, E.; HOULES, C.; SUDAKEVITZ, D.; WIMMEROVA, M.; GAUTIER, C.; PEREZ, S.; WU, A. M.; GILBOA-GARBER, N.; IMBERTY, A. Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. **Nat. Struct. Biol.**, v. 9, p. 918-921, 2002.

MOHAN, V. P.; SCANGA, C. A.; YU, K.; SCOTT, H. M.; TANAKA, K. E.; TSANG, E.; TSAI, M. M.; FLYNN, J. L.; CHAN, J. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1847-1855, 2001.

MORENO, F. B. ; FACÓ, F. ; CECCATTO, V. M. ; SAMPAIO, A. H.; COSTA, A. S. B.; FREITAS, J. L. T. ; NOGUEIRA, L. L. ; LIMA, M. E. ; LIMA, J. L. ; CAVADA, B. S. Matching of carbohydrate-binding domains in *Arabidopsis thaliana* genome: development of a lectin database. **Online J. Bioinformatics**, v. 4, p. 96-105, 2003.

NORMAN, E.; DE SMET, K. A.; STOKER, N. G.; RATLEDGE, C.; WHEELER, P. R.; DALE, J. W. Lipid synthesis in mycobacteria: characterization of the biotin carboxyl carrier protein genes from *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 2525-2531, 1994.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WHO). Disponível em: <[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2006/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2006/en/)>

PAGÁN-RAMOS, E.; SONG, J.; MCFALONE, M.; MUDD, M. H.; DERETIC, V. Oxidative stress response and characterization of the *oxyR-ahpC* and *furA-katG* loci in *Mycobacterium marinum*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 4856-4864, 1998.

PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K. L.; BENTLEY, S. D.; HOLDEN, M. T.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DAVIES, R. M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HAQUE, A.; HIEN, T. T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; LARSEN, T. S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; O'GAORA, P.; PARRY, C.; QUAIL, M.; RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. **Nature**, v. 413, p. 848-452, 2001.

POULET, S.; COLE, S. T. Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. **Arch. Microbiol.**, v. 163, p.87-95, 1995.

RAMAKRISHNAN, L.; FEDERSPIEL, N. A.; FALKOW, S. Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. **Science**, v. 288, p. 1436-1439, 2000.

RASGOTI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. **Rev. Sci. Tech.**, v. 20, p. 21-54, 2001.

RILEY, L.W. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 1475-1478, 2006.

ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N.; RODRIGUES, V. S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Rev. Saúde Públ.**, v. 36, p. 525-532, 2002.

RUST, A. G.; MONGIN, E.; BIRNEY, E. Genome annotation techniques: new approaches and challenges. **Drug Discovery Today**, v.7, p.70-76, 2002.

SALO, W. L.; AUFDERHEIDE, A. C.; BUIKSTRA, J.; HOLCOMB, T. A. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 2091-2094, 1994.

SAMTEN, B.; THOMAS, E. K.; GONG, J.; BARNES, P. F. Depressed CD40 ligand expression contributes to reduced gamma interferon production in human tuberculosis. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3002-3006, 2000.

SCHULTZ, J. et al. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p.231-234, 2000.

SHERMAN, D. R.; MDLULI, K.; HICKEY, M. J.; BARRY, C. E.; STOVER, C. K. AhpC, oxidative stress and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Biofactors**, v. 10, p. 211-217, 1999.

SILVA, C. L.; BONATO, V. L.; LIMA, K. M.; COELHO-CASTELO, A. A.; FACCIOLI, L. H.; SARTORI, A.; DE SOUZA, A. O.; LEÃO, S. C. Cytotoxic T cells and mycobacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 197, p. 11-18, 2001.

SINGH, D. D.; CHANDRAN, D.; JEYAKANI, J.; CHANDRA, N. Scanning the genome of *Mycobacterium tuberculosis* to identify potential lectins. **Protein Pept. Lett.**, v. 14, p. 683-691, 2007.

SINGH, R.; SINGH, A.; TYAGI, A. K. Deciphering the genes involved in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 85, p. 325-335, 2005.

SMITH, C.V.; SACCHETTINI, J. C. *Mycobacterium tuberculosis*: a model system for structural genomics. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 13, p. 658-664, 2003.

SPELLBERG, B.; EDWARDS, J. E. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 76-102, 2001.

SPRINGER, B.; MASTER, S.; SANDER, P.; ZAHRT, T.; MCFALONE, M.; SONG, J.; PAPA VINASASUNDARAM, K. G.; COLSTON, M. J.; BOETTGER, E.; DERETIC, V. Silencing of oxidative stress response in *Mycobacterium tuberculosis*: expression patterns of *ahpC* in virulent and avirulent strains and effect of *ahpC* inactivation. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 5967-5973, 2001.

SREEVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K. E.; CONNELL, N. D.; KREISWIRTH, B. N.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 9869-9874, 1997.

STOESSER, G.; et al. The EMBL nucleotide sequence database. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 21-26, 2002.

TEKAIA, F.; GORDON, S.; GARNIER, T.; BROSCHE, R.; BARRELL, B. G.; COLE, S. T. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. **Tuber Lung Dis.**, v. 79, p. 329-342, 1999.

TEMMERMAN, S.; PETHE, K.; PARRA, M.; ALONSO, S.; ROUANET, C.; PICKETT, T.; DROWART, A.; DEBRIE, A. S.; DELOGU, G.; MENOZZI, F. D.; SERGHERAERT, C.; BRENNAN, M. J.; MASCART, F.; LOCHT, C. Methylation-

dependent T cell immunity to *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin. **Nat. Med.**, v. 10, p. 935-941, 2004.

TOOSSI, Z. Virological and immunological impact of tuberculosis on human immunodeficiency virus type 1 disease. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 1146-1155, 2003.

TRAJKOVIC, V.; NATARAJAN, K.; SHARMA, P. Immunomodulatory action of mycobacterial secretory proteins. **Microbes Infect.**, v. 6, p. 513-519, 2004.

TURNER, J.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; ELLIS, D. L.; BASARABA, R. J.; KIPNIS, A.; ORME, I. M.; COOPER, A. M. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6343-6351, 2002.

VAN DER KLEIJ, D.; VAN DEN BIGGELAAR, A. H.; KRUIZE, Y. C.; RETRA K, FILLIE Y, SCHMITZ M, KREMSNER PG, TIELENS AG, YAZDANBAKHSH M. Responses to Toll-like receptor ligands in children living in areas where schistosome infections are endemic. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 1044-1051, 2004.

VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W.; DE HAAS, P. E.; SOLL, D. R.; VAN EMBDEN, J. D. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 2578-2586, 1991.

VERBON, A.; JUFFERMANS, N.; VAN DEVENTER, S. J.; SPEELMAN, P.; VAN DEUTEKOM, H.; VAN DER POLL, T. Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 115, p.110-113, 1999.

WAYNE, L. G. a. G. P. K. The mycobacteria. In: SNEATH, N.S.M.P.H.A.; SHARPE, M. E.; HOLT. J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: The Williams and Wilkins, 1986. p.1435-144557.

XU, Y.; UBERBACHER, E. C. Automated gene identification in large-scale genomic sequences. **J. Computational Biol.**, v. 4, p. 325-338, 1997.

ZHANG, Y.; TELENTI, A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: HATFUL, G. F.; JACOBS, W. R. **Molecular Genetics of Mycobacteria**. ASM Press, 2000. p. 235-254.

ZHANG, Y.; DHANDAYUTHAPANI, S.; DERETIC, V. Molecular basis for the exquisite sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 13212-13216, 1996.

ZHAO, W.; SCHOREY, J. S.; GROGER, R.; ALLEN, P. M.; BROWN, E. J.; RATLIFF, T. L. Characterization of the fibronectin binding motif for a unique mycobacterial fibronectin attachment protein, FAP. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 4521-4526, 1999.

ZINK, A. R.; GRABNER, W.; REISCHL, U.; WOLF, H.; NERLICH, A. G. Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. **Epidemiol. Infect.**, v. 130, p. 239-249, 2003.