

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**Lucas de Lima Nogueira**

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA CODIFICADA  
PELO GENE *RV1419* DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
DURANTE A INFECÇÃO: POTENCIAL DIAGNÓSTICO E  
PROPRIEDADES IMUNOREGULATÓRIAS**

Florianópolis  
2012



Lucas de Lima Nogueira

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA CODIFICADA  
PELO GENE RV1419 DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS  
DURANTE A INFECÇÃO: POTENCIAL DIAGNÓSTICO E  
PROPRIEDADES IMUNOREGULATÓRIAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. André Báfica

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nogueira, Lucas de Lima  
INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA CODIFICADA PELO GENE  
RV1419 DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DURANTE A INFECÇÃO:  
POTENCIAL DIAGNÓSTICO E PROPRIEDADES IMUNOREGULATÓRIAS  
[tese] / Lucas de Lima Nogueira ; orientador, André  
Báfica - Florianópolis, SC, 2012.  
62 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Tuberculose. 3. lectina. 4.  
biomarcadores. 5. Mycobacterium tuberculosis. I. , André  
Báfica. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

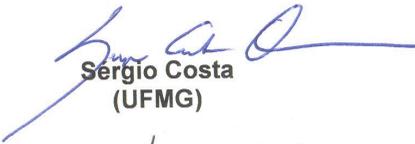
**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA  
CODIFICADA PELO GENE RV1419 DE  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DURANTE A  
INFECÇÃO: POTENCIAL DIAGNÓSTICO E  
PROPRIEDADES IMUNOREGULATÓRIAS**

**LUCAS DE LIMA NOGUEIRA**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma  
final pelos membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores Doutores:

**André Báfica**  
Presidente (FMC/UFSC)

  
**Manoel Barral-Neto**  
(Fiocruz)

  
**Sergio Costa**  
(UFMG)

  
**João Marques**  
(UFMG)

  
**Giles Alexander Rae**  
(FMC/UFSC)

**Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima**  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC

Florianópolis, 13 de Abril de 2012



Dedico esta tese à minha família  
Alice, Antonieta, Camila e Lívia.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. André Báfica, pela oportunidade e experiência construtiva em trabalhar no seu laboratório;

Aos meus colegas de trabalho Nicole Menezes, Álvaro Menin, Tatiany Faria e Mariane Roman pelo apoio constante e discussões científicas;

Aos demais colegas e professores do LIDI;

A todos os professores dos Departamentos de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina;

Ao meu orientador no exterior Lee Riley, pela experiência enriquecedora no seu laboratório;

A todos os colaboradores científicos do manuscrito desta tese;

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia;

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram cientificamente para este trabalho

Muito obrigado



The art of the researcher is first of all to find  
himself a good boss,

(André Lwoff)



## RESUMO

A tuberculose é uma doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* que mata anualmente cerca de 2 milhões de pessoas no mundo. Dado um alto impacto na saúde pública causado pelo *M. tuberculosis*, a ausência de uma vacina preventiva eficaz e o surgimento de cepas resistentes ao tratamento convencional, existe uma clara necessidade de um melhor entendimento dos mecanismos de imunopatogênese da tuberculose e, sobretudo, a identificação de fatores determinantes do bacilo envolvidos nesse processo. Nesse contexto, as informações geradas pelo projeto genoma de seqüenciamento do *M. tuberculosis* apresentam um grande potencial a ser explorado, principalmente no que diz respeito a moléculas de superfície/secretadas que possam ser identificadas e avaliadas quanto ao seu envolvimento nos eventos iniciais de infecção e imunogenicidade. No presente estudo, nós identificamos uma nova lectina secretada de *M. tuberculosis* por uma abordagem bioinformática que é reconhecida durante a fase ativa da tuberculose em humanos tanto em termos de indução de IFN- $\gamma$  em células mononucleares do sangue periférico quanto na produção de anticorpos IgG anti-sMTL-13. Essa produção de anticorpos diminui logo após 1-2 meses de tratamento e permanece em níveis basais até os pacientes atingirem cura clínica, sugerindo que anticorpos anti-sMTL-13 poderiam ser utilizados como um biomarcador de sucesso terapêutico. Em adição, estudos de deleção gênica revelaram que o gene Rv1419 não é essencial para o crescimento *in vitro* do *M. Tuberculosis* em meio de cultura, mas que o mesmo parece afetar o crescimento intracelular do bacilo e modula a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos da linhagem RAW 264.7. Em conjunto, os nossos achados demonstram a existência de um novo antígeno de *M. tuberculosis* com potencial de uso em diagnóstico e de gerar informações relevantes sobre a biologia da interação do patógeno com o hospedeiro.

**Palavras-chave:** Tuberculose, lectina, biomarcador, *Mycobacterium tuberculosis*



## ABSTRACT

Tuberculosis remains a major public health problem throughout the world and one-third of the world population carries an asymptomatic infection, which results in eight million new cases of tuberculosis and two million deaths every year. In general, infection by *Mycobacterium tuberculosis* leads to a latent state in which the host is able to control the pathogen growth. While effective cellular immune responses are suggested as critical to control *M. tuberculosis* growth inside macrophages, it has been demonstrated that mycobacteria-associated factors play an important role in tuberculous immunopathogenesis. In this study, we have identified a secreted 13 kDa lectin from *M. tuberculosis* by homology search of a non-redundant lectin database. Bioinformatic analysis revealed that sMTL-13 belongs to the ricin-type b-trefoil family of proteins containing a Sec-type signal peptide present in *M. tuberculosis* complex species, but not in nontuberculous mycobacteria. Following heterologous expression of sMTL-13 and generation of an mAb (clone 276.B7/IgG1k), we confirmed that this lectin is present in culture filtrate proteins from *M. tuberculosis* H37Rv, but not in non-tuberculous mycobacteria-derived culture filtrate proteins. In addition, sMTL-13 leads to an increased IFN- $\gamma$  production by PBMC from active tuberculosis patients. Furthermore, sera from tuberculosis patients displayed high titers of IgG Ab against sMTL-13, a response found to be decreased following successful antituberculosis therapy. We also investigated the role of Rv1419 gene of *M. tuberculosis* during in vitro infection. Our work shows that bacterial replication kinetics of Rv1419 mutant and wild type bacterium were comparable in liquid culture under static conditions. Moreover, the Rv1419 mutant was not impaired in its ability to grow upon macrophage infection. However, its ability to stimulate key cytokine such as TNF- $\alpha$  was reduced, which is in line with CFU counts at earlier time points post-infection (24h). Together, our findings reveal a secreted 13 kDa ricin-like lectin from *M. tuberculosis*, which is immunologically recognized during active tuberculosis and could serve as a biomarker of disease treatment. We believe that sMTL-13 is an important component of the bacterial-host interplay.

Key words: Tuberculosis, lectin, biomarkers, *Mycobacterium tuberculosis*



## LISTA DE FIGURAS

		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b>	Representação esquemática da estratégia utilizada para amplificação das regiões genômicas de interesse.....	49
<b>Figura 2.</b>	Ilustração da estratégia utilizada para gerar a deleção do gene <i>Rv1419</i> de <i>M. tuberculosis</i> .....	51
<b>Figura 3.</b>	Análise <i>in silico</i> do gene <i>Rv1419</i> .....	54
<b>Figura 4.</b>	Purificação da SMTL-13 recombinante e análise em gel SDS-PAGE 12% corado com azul de coomassie.....	55
<b>Figura 5.</b>	Ensaio de hemaglutinação da sMTL-13 frente a suspensão de 2% de eritrócitos de coelho.....	56
<b>Figura 6.</b>	A proteína codificada pelo gene <i>Rv1419</i> é detectada na fração CFP de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	57
<b>Figura 7.</b>	Citometria de fluxo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv marcado com o anticorpo monoclonal anti-sMTL-13.....	58
<b>Figura 8.</b>	Marcação <i>in situ</i> para sMTL-13 em pacientes com tuberculose ativa.....	59
<b>Figura 9.</b>	Resposta imune adaptativa induzida contra SMTL-13 durante a tuberculose ativa em humanos.....	60
<b>Figura 10.</b>	Análise de curvas ROC anti-sMTL-13 vs. Anti-ESAT-6.....	61
<b>Figura 11.</b>	Reação de PCR para avaliação da deleção do gene <i>Rv1419</i> em <i>Mtb</i> H37Rv.....	62
<b>Figura 12.</b>	Unidades formadoras de colônia (CFU) nos tempos de 4 horas (Dia 0) e 4 dias após infecção.....	62
<b>Figura 13.</b>	Ensaio de sobrevivência intracelular e secreção de TNF- $\alpha$ .....	63



## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> Principais fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose.....	31



## LISTA DE ABREVIações

- AUC** – Área sob a curva  
**CD4** – Co-receptor de linfócito T auxiliar  
**CD8** – Co-receptor de linfócito T citotóxico  
**CFP** – Filtrado de cultura do *Mycobacterium tuberculosis*  
**CFU** – Unidade formadora de colônia (do inglês, *colony-forming unit*)  
**CMSP** – Células mononucleares do sangue periférico  
**CW** – parede celular (do inglês, *cell wall*)  
**DMEM** - Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco  
**dNTPs** - Deoxinucleotídeos  
**ELISA** - Ensaio imunoenzimático  
**IFN** - Interferon  
**IL** – Interleucina  
**KO** - Knockout  
**M** – Membrana (do inglês, *membrane*)  
**NFκB** - Fator nuclear κB  
**PBS** - Tampão fosfato salina  
**PCR** – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)  
**sMTL-13** – Lectina secretada de *M. tuberculosis* de 13 kDa  
**TB** - Tuberculose  
**TLR** – Receptor de reconhecimento padrão tipo Toll  
**TNF-α** – Fator de necrose tumoral α  
**WCL** – Lisado celular total (do inglês, *whole cell lysate*)



## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
1.1 A tuberculose como um importante problema de saúde pública.....	27
1.2 Abordagens terapêuticas.....	28
1.3 Aspectos gerais da resposta imune do hospedeiro.....	31
1.4 Métodos de diagnóstico e imunoprofilaxia contra a tuberculose.....	34
1.5 Identificação de fatores determinantes do Mycobacterium tuberculosis na sua interação com o hospedeiro.....	37
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
2.1 Geral.....	41
2.2 Específico.....	41
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 Casuística.....	42
3.2 Pacientes.....	42
3.3 Análise <i>in silico</i> .....	42
3.4 Extração DNA genômico.....	43
3.5 Expressão heteróloga.....	43
3.6 Purificação da proteína recombinante.....	44
3.7 Ensaio de hemaglutinação.....	45

3.8 Frações micobacterianas.....	45
3.9 Geração do anticorpo monoclonal.....	45
3.10 Marcação de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> com o anticorpo anti-Stml13.....	46
3.11 Detecção de anticorpos contra SMTL-13 por ELISA.....	46
3.12 Detecção da SMTL-13 por <i>western blotting</i> .....	47
3.13 Análise imunohistoquímica.....	47
3.14 Quantificação dos títulos de IgG anti-SMTL-13.....	47
3.15 Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP).....	48
3.16 Re-estimulação <i>in vitro</i> de secreção de IFN- $\gamma$ .....	48
3.17 Geração de uma cepa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> deficiente para o gene <i>Rv1419</i> .....	49
3.17.1 Crescimento e manutenção das cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	49
3.17.2 Construção do vetor.....	49
3.17.3 Avaliação da sobrevivência intracelular e indução de TNF- $\alpha$ após a infecção de macrófagos RAW 264.7.....	51
3.18 Análise estatística.....	52
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
4.1 Análise <i>in silico</i> .....	53
4.2 Expressão heteróloga da proteína SMTL-13.....	54

4.3 Purificação da SMTL-13 por cromatografia de afinidade.....	55
4.4 Ensaio de hemaglutinação.....	55
4.5 O produto codificado pelo gene <i>Rv1419</i> é ativamente secretado.....	56
4.6 SMTL-13 é detectada in vivo durante a fase ativa da tuberculose em humanos.....	58
4.7 SMTL-13 induz uma resposta imune celular e humoral em pacientes com tuberculose ativa.....	59
4.8 Geração de uma cepa mutante de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> deficiente no gene <i>Rv1419</i> .....	61
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A tuberculose como importante problema de saúde pública

A tuberculose (TB) humana é uma doença infecciosa, contagiosa, com manifestações clínicas agudas. A infecção é causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e estimativas baseadas em dados epidemiológicos sugerem que um terço da população mundial esteja infectada com esta bactéria, sendo que 9,4 milhões de pessoas desenvolvem a doença ativa, com cerca de dois milhões de óbitos por ano (Who, 2010). Ainda importante, 95% dos casos de TB ativa e 98% das mortes ocorrem em países pobres e em desenvolvimento, onde a forma pulmonar da doença contribui para 85% dos casos notificados (Who, 2010). Embora a introdução da vacinação com o *Mycobacterium bovis* BCG tenha promovido uma queda estável da incidência da TB entre as décadas de 50 e 80 nos países desenvolvidos, tem sido observado uma ressurgência de casos novos nos últimos anos (Thaiss *et al.*, 2012). Esse fenômeno é impactado ainda por diferentes fatores como o aumento da urbanização, guerras civis, migrações em massa de populações, aumento da pobreza e a epidemia do vírus da imunodeficiência humana ou HIV (Thaiss *et al.*, 2012). Mais preocupante ainda, em termos de saúde pública, é o surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a diferentes fármacos, apresentando neste caso resistência à isoniazida e rifampicina que são utilizados como fármacos de primeira linha (Who, 2010).

A fase ativa da TB caracterizada pelo aparecimento de sintomas clínicos está relacionada com a falta de controle do crescimento do *M. tuberculosis* pelo sistema imunológico do hospedeiro. A TB primária é classificada desta forma em indivíduos que desenvolvem doença durante os primeiros 5 anos após a infecção primária (Who, 2004). Embora a resposta imune seja capaz de controlar inicialmente a infecção, alguns fatores podem contribuir para a progressão da forma ativa da doença, sendo a infecção com o vírus HIV considerada a de maior risco associado à reativação da TB em adultos. Outras condições médicas tais como terapia com corticóides, quimioterapia, diabetes, câncer e deficiências nas vitaminas D ou A também podem contribuir para esse fato, uma vez que promovem alterações no sistema imune (Karyadi *et al.*, 2002). Além disso, polimorfismos genéticos que acarretam mudanças na produção de IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$ , citocinas produzidas por células de defesa do hospedeiro, estão relacionados com o desenvolvimento da doença primária (Hirsch *et al.*, 1999; Keane *et al.*, 2001; Cooper *et al.*, 2011).

A TB latente é caracterizada pela presença do *M.tuberculosis* e ausência de sintomas clínicos em indivíduos cronicamente infectados, podendo se estabelecer a partir de um controle inicial da infecção, ou após doença primária em indivíduos “curados” espontaneamente ou por meio de tratamento. Pessoas expostas ao *M. tuberculosis* são geralmente resistentes à infecção, apresentando uma resposta imune mediada por células que controla o crescimento do bacilo no sítio inicial de infecção, ou seja, no parênquima pulmonar e nos linfonodos drenantes locais (Cardona, 2007). Isso tem como consequência a formação do Complexo de Ghon o qual consiste em focos de infecção calcificados no pulmão que podem perdurar por décadas. Por outro lado, já foi observada a presença de *M. tuberculosis* em tecidos pulmonares normais de indivíduos que morreram de outras causas que não TB, infectando diferentes tipos celulares e permanecendo latente na ausência de qualquer reação histológica (Hernandez-Pando *et al.*, 2000). Essa forma clínica também pode progredir para doença ativa devido a diversos fatores, sendo a infecção com o HIV novamente o principal fator de risco.

## 1.2 Abordagens terapêuticas

O tratamento atual da TB, diga-se a duração e os fármacos utilizados, é resultado de uma série de ensaios clínicos que foram conduzidos por mais de 20 anos pelo *Medical Research Council* Britânico (Fox *et al.*, 1999). O tratamento de pacientes sem histórico de TB e infectados com cepas sensíveis aos fármacos utilizados tem duração de cerca de seis meses e incluem isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol administrados num regime diário ou intermitentemente por dois meses, seguidos de rifampicina e isoniazida por quatro meses (Lienhardt *et al.*, 2010) (Tabela 1). Essa forma de tratamento que usa rifampicina na fase intensiva, apesar de oferecer algumas vantagens práticas, tem sido questionada em termos de eficácia quando comparada ao regime de seis meses de tratamento (Jindani *et al.*, 2004), existindo poucas evidências que favoreçam esse tipo de abordagem. Dessa forma, a Organização Mundial da Saúde estabelece que o uso da rifampicina deve ser feito durante os seis meses de tratamento e sob supervisão. No caso de pacientes com histórico de tratamento para TB, o novo período de tratamento, porém, é mais prolongado. Os fármacos recomendados são estreptomicina pelos primeiros dois meses além de isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida nos primeiros três meses, seguidos de cinco meses com

isoniazida, rifampicina e etambutol (Who, 2008). Esse tipo de tratamento foi originalmente designado em locais com baixa prevalência inicial de resistência a fármacos, sendo também considerado apropriado para pacientes que apresentem resistência à isoniazida (Lienhardt *et al.*, 2010). Entretanto, esse esquema terapêutico tem sido criticado com relação à baixa eficiência em locais onde a resistência inicial a fármacos é elevada (Espinal e Raviglione, 2008). Embora o regime de oito meses de tratamento seja amplamente utilizado no mundo, ensaios clínicos randomizados para testar sua eficácia ainda não foram conduzidos (Menzies *et al.*, 2009).

O tratamento das formas de TB resistentes a múltiplos fármacos (TB-MDR), incluindo a forma extrema (TB-XDR), envolve a combinação de fármacos de primeira e segunda linha. Este último grupo compreende agentes injetáveis tais como canamicina, amicacina, capreomicina e streptomina, assim como fluoroquinolonas (Lienhardt *et al.*, 2010). Entretanto, estas abordagens são mais complicadas devido ao alto custo, alta toxicidade, baixa aderência e longa duração, carecendo portanto de um bom prognóstico para os pacientes e dificultando o controle da disseminação das TB-MDR e TB-XDR (Mak *et al.*, 2008; Kliiman e Altraja, 2009). Um outro fator importante de abordagem terapêutica que deve ser considerado seria o tratamento de pacientes com HIV e TB, uma vez que existem potencialmente dois problemas, a saber: a) a interação medicamentosa entre a rifampicina e alguns fármacos anti-retrovirais, como inibidores de proteases; e b) o surgimento de uma síndrome inflamatória de reconstituição imune, piorando o quadro clínico do paciente (Dean *et al.*, 2002; Lawn *et al.*, 2005; Meintjes *et al.*, 2008). A interação medicamentosa ocorre devido ao fato da rifampicina promover ativação de um complexo enzimático no fígado (citocromo P450), o que reduz os níveis plasmáticos de fármacos metabolizados por esta via, no caso os inibidores de proteases presentes em algumas terapias anti-retrovirais (L'homme R *et al.*, 2009). Embora nos últimos 30 anos têm sido observado o desenvolvimento de novos compostos que podem ser potencialmente utilizados para o tratamento da tuberculose, o grande desafio da área é entender como a terapia funciona. Métodos modernos de farmacocinética/farmacodinâmica (FC/FD) podem fornecer as bases biológicas para o entendimento e interpretação dos resultados de um ensaio clínico (Davies e Nuermberger, 2008). Tais métodos têm sido usados para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que otimizam a eficiência desse processo através da análise robusta de curvas dose-resposta (Sheiner e Steimer, 2000; Miller *et al.*, 2005). Em

termos de terapia de doenças infecciosas, a análise FC-FD tem demonstrado sua importância prática na pneumonia aguda, na infecção com o vírus HIV e malária (Svensson *et al.*, 2002; Schentag *et al.*, 2003; Rosario *et al.*, 2005; Winston *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2006). Em modelos *in vitro* de avaliação de novos fármacos com atividade antimicobacteriana, o parâmetro farmacodinâmico mais simples é a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que é a concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento de 90-99% de unidades formadoras de colônia em condições ótimas de crescimento (Goldman *et al.*, 2007). Entretanto, o CIM não representa a concentração na qual o crescimento bacteriano cessa e não distingue entre atividade bactericida/bacteriostática. Além disso, a exposição ao fármaco *in vitro* não representa de forma acurada a dinâmica das relações FC-FD *in vivo*, e nem as condições de crescimento são representativas para bactérias que causam infecções crônicas (Mouton e Vinks, 2005).

A avaliação da eficácia *in vivo* de novos regimes terapêuticos ainda depende do modelo murino. Estudos de média duração (cerca de dois meses) podem estimar a atividade bactericida de fármacos simples, ou em combinação, pela contagem de unidades formadoras de colônia (CFUs) de homogenados teciduais. Entretanto, acredita-se que experimentos de longa duração são necessários para avaliar a atividade esterilizante, uma vez que não se pode assumir que culturas negativas em tempos menores seja um indicador desse tipo de atividade (Davies e Nuermberger, 2008). Outros métodos baseiam-se no modelo murino denominado “Cornell”, o qual utiliza uma terapia intensiva na fase inicial para obtenção de culturas negativas e posteriormente testa a habilidade de fármacos simples/combinação de prevenir um relapso em situações nas quais os animais deixam de receber o tratamento. É um método, porém, que demanda muito tempo, arriscado e com o potencial de fornecer dados não consistentes (Scanga *et al.*, 1999). Apesar da praticidade em se trabalhar com o modelo murino, esses animais não desenvolvem reações histopatológicas que são características da tuberculose pulmonar humana, tais como a necrose caseosa e lesões cavitárias. Dessa forma, parâmetros FC-FD podem ser diferentes e cuidados devem ser tomados quando do escalonamento de doses entre animais e humanos devido às diferenças metabólicas e possíveis interações farmacocinéticas (Grosset *et al.*, 1992; Rhoades *et al.*, 1997). Em adição, a descoberta de novos biomarcadores para avaliação da eficiência de ensaios clínicos é de fundamental importância para desenvolver novas abordagens terapêuticas que reduzam o tempo de

tratamento, os efeitos colaterais e as possíveis interações entre medicamentos, além de cura estéril.

**Tabela 1** – Principais fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose (Loeffler, 2009).

<b>ISONIAZIDA</b>	
Classe	Hidrazida do ácido isonicotínico.
Atividade	Bactericida, especialmente em bactérias de crescimento rápido. Afeta a síntese de ácidos micólicos na parede celular.
Farmacocinética	Alcança a concentração máxima no plasma após 1-2 horas da administração oral.
<b>ETAMBUTOL</b>	
Classe	Não especificada.
Atividade	Bacteriostático, inibindo a síntese da parede celular
Farmacocinética	Alcança a concentração máxima no plasma após 2-4 horas da administração oral.
<b>RIFAMPICINA</b>	
Classe	Rifamicina
Atividade	Bactericida, inibindo a síntese de proteínas.
Farmacocinética	Alcança a concentração máxima no plasma após 1-4 horas da administração oral.
<b>PIRAZINAMIDA</b>	
Classe	Derivado sintético da nicotinamida.
Atividade	Bactericida; mecanismo ainda não conhecido
Farmacocinética	Alcança a concentração máxima no plasma após 2-4 horas da administração oral.

### 1.3 Aspectos gerais da resposta imune do hospedeiro

A resposta imune inata que compreende diferentes células e apresenta seu próprio sistema de receptores para reconhecer a presença de patógenos é fundamental para a iniciação e regulação da resposta imune adaptativa do hospedeiro. Dessa forma, a resposta de defesa contra o *M. tuberculosis* é dominada pela interação do sistema imune inato com o adaptativo. Após a inalação e deposição de pequenas partículas contaminadas no alvéolo pulmonar, a bactéria interage com células apresentadoras de antígenos, como macrófagos alveolares residentes, células dendríticas e monócitos recrutados da periferia (Torrado *et al.*, 2011). Além da expressão de receptores fagocíticos,

esses tipos celulares também expressam receptores do tipo Toll (TLRs) que reconhecem padrões moleculares conservados presentes em patógenos (Medzhitov e Janeway, 2000). Entretanto, sugere-se que sinais adicionais relacionados à atividade de bactérias patogênicas são importantes para a discriminação entre essas e bactérias comensais presentes no hospedeiro (Fontana e Vance, 2011). A ligação de TLRs com seus ligantes cognatos inicia uma série de vias de transdução de sinal que culminam na ativação do fator nuclear-kappa B (NF $\kappa$ B) e na indução de citocinas e quimiocinas que são determinantes para o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa contra o patógeno (Aderem e Ulevitch, 2000), sendo composta por uma resposta humoral e celular. No contexto da infecção com o *M. tuberculosis*, os receptores TLR2, TLR4 e TLR9 estão envolvidos no reconhecimento da bactéria. O receptor TLR2 forma heterodímeros com TLR1 ou TLR6 os quais reconhecem componentes da parede celular micobacteriana (Jones *et al.*, 2001; Means *et al.*, 2001; Thoma-Uszynski *et al.*, 2001). Em adição, animais deficientes em TLR2 são mais susceptíveis à infecção com *M. tuberculosis* durante a fase crônica (Drennan *et al.*, 2004). O papel do TLR4, contudo, ainda é pouco entendido, e alguns trabalhos já demonstraram resultados discordantes em modelos *in vivo* (Abel *et al.*, 2002; Reiling *et al.*, 2002). O TLR9, por sua vez, reconhece motivos não metilados de CpG presentes no DNA genômico bacteriano. Estudos *in vitro* demonstraram que esse receptor está envolvido na produção de IL-12 por células dendríticas infectadas, sendo que animais deficientes para TLR9, desafiados com alta dose de *M. tuberculosis*, morrem mais rápido do que os animais controles (Bafica *et al.*, 2005; Pompei *et al.*, 2007).

Os linfócitos T  $\gamma\delta$ , células “natural killer” (NK), e células T NK (NKT) também participam da resposta imune na TB. Alguns estudos experimentais têm demonstrado que na resposta do hospedeiro a indução de células T  $\gamma\delta$  precede a indução e migração de linfócitos T CD4 e CD8 para o sítio de infecção e, dessa forma, apresentam um papel importante na modulação da resposta efetora contra a TB. Durante a infecção, o recrutamento inicial de células para o sítio de infecção no pulmão é mediado por quimiocinas como CXCL2 e CXCL10, e interleucinas, IL-12 e IL-17, secretadas por macrófagos e células dendríticas. Uma vez ativadas, as células T  $\gamma\delta$  secretam IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . A produção destas citocinas aumenta a capacidade bactericida dos macrófagos (Ferrero *et al.*, 2003; Lockhart *et al.*, 2006; Cooper, 2009).

A resposta imune humoral é mediada por anticorpos e tem sido primariamente utilizada para fins de diagnóstico (Kunnath-Velayudhan

e Gennaro, 2011). Considerando que o *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular, poderia ser pensado que esse tipo de resposta não apresentaria um papel protetor. Entretanto, esta visão foi questionada por alguns estudos que mostraram a eficácia da imunidade humoral contra outros tipos de patógenos intracelulares (Robbins *et al.*, 1996; Glatman-Freedman, 2006; Pluddemann *et al.*, 2011), sugerindo que a mesma pode também contribuir para a proteção contra a TB. Em dois estudos independentes, por exemplo, foi demonstrado que anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície do *M. tuberculosis* prolongaram a sobrevivência de animais infectados com doses letais de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, sendo observado a formação de granulomas bem organizados e localizados (Teitelbaum *et al.*, 1998; Chambers *et al.*, 2004). Em adição, sabe-se que o *M. tuberculosis* é capaz de modular vias de morte celular do hospedeiro e que, portanto, antígenos solúveis estariam disponíveis para ativação de linfócitos B num determinado momento da infecção, podendo contribuir para a prevenção da disseminação do bacilo (Behar *et al.*, 2011).

A imunidade mediada por células, por sua vez, é considerada a mais importante na resistência à infecção por *M. tuberculosis*. No modelo murino, o número de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativadas nos linfonodos drenantes no pulmão aumentam após uma semana de infecção (Feng *et al.*, 1999; Serbina *et al.*, 2000). Por volta da quarta semana, as células T CD4 e CD8 migram para o pulmão e apresentam marcadores fenotípicos de células efetoras e/ou de memória. Cerca de 50% dessas células são CD69 positivas, indicando que células T ativadas estão migrando para o sítio de infecção e interagindo com células apresentadoras de antígenos (Cooper, 2009). Essas interações culminam na formação do granuloma que é a estrutura histopatológica característica da infecção por *M. tuberculosis*. Essa estrutura pode variar em composição celular, tamanho e distribuição, apresentando variações entre indivíduos diferentes e até mesmo dentro do mesmo indivíduo (Kunnath-Velayudhan e Gennaro, 2011).

A apoptose também tem sido descrita como parte da resposta imune do hospedeiro contra o patógeno, em que células mortas liberam vesículas apoptóticas que são fagocitadas por outras células apresentadoras de antígeno, sendo estas envolvidas na ativação de linfócitos T CD8 por meio de um processo denominado “apresentação cruzada” (Winau *et al.*, 2006). Em modelos de infecção foi demonstrado que o *M. tuberculosis* é capaz de inibir a apoptose, modulando a expressão de proteínas relacionadas ao processo como Fas, ligante de Fas, Bcl-2 e Bax, e criando, dessa forma, um ambiente adequado para o

seu crescimento no interior de macrófagos infectados (Behar *et al.*, 2011).

A citocina IFN- $\gamma$  é considerada como sendo crucial na imunidade protetora contra o *M. tuberculosis* (Cooper, 2009). No interior de granulomas, IFN- $\gamma$  é capaz de estimular diferentes vias relacionadas ao processo de eliminação do bacilo (Saunders e Britton, 2007). Portanto, a deficiência na produção de IFN- $\gamma$  ou do seu receptor em humanos e camundongos está associada a uma maior susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis* (Flynn *et al.*, 1993; Ottenhoff *et al.*, 1998; Sullivan *et al.*, 2005). De fato, esta citocina é importante no processo de apresentação de antígenos e induz a transcrição de pelo menos 200 genes em macrófagos, incluindo aumento da expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe II e a produção de moléculas efetoras tais como radicais de oxigênio, óxido nítrico e outros intermediários reativos de nitrogênio (Scanga *et al.*, 2001; Chan e Flynn, 2004; Sullivan *et al.*, 2005).

#### **1.4 Métodos de diagnóstico e imunoprofilaxia contra a tuberculose**

Os métodos atuais para o diagnóstico da TB carecem de melhorias, apresentando variações em parâmetros como sensibilidade, especificidade, rapidez e custo. O diagnóstico é feito pela demonstração da presença de bacilos álcool-ácido resistentes em amostras de escarro, o que é pouco sensível nos casos em que os pacientes são paucibacilares. Além disso, a cultura microbiológica é importante para o diagnóstico definitivo e para o teste de susceptibilidade às drogas (Evans, 2011). Embora a detecção de bacilos álcool-ácido resistentes em amostras clínicas não seja um procedimento caro, o crescimento em pode demorar pelo menos 6 meses meio sólido ou de 7-21 dias em meio líquido. A cultura em meio sólido permite o exame direto da morfologia da colônia e a identificação de culturas mistas, sendo que a líquida permite um diagnóstico mais rápido, porém, menos preciso (Evans, 2011). Do ponto de vista clínico, alguns dos achados radiográficos sugestivos de TB são lesões cavitárias, adenopatias hilares e/ou paratraqueais e opacidades pulmonares nas partes superiores. Em alguns pacientes com doença ativa primária e aqueles co-infectados com o vírus HIV, esses achados radiográficos podem ser mais distintos, incluindo infiltrados micronodulares de padrão miliar (Who, 2004).

Testes imunológicos baseados na detecção de anticorpos contra antígenos do *M. tuberculosis* no soro de pacientes com doença ativa constituem uma opção interessante em termos práticos, uma vez que são

testes rápidos, baratos e que podem ser executados nas condições encontradas em países em desenvolvimento (Kunnath-Velayudhan *et al.*, 2010). Os métodos baseados na técnica do ELISA, por exemplo, já são usados para a pesquisa de anticorpos contra antígenos complexos e purificados do *M. tuberculosis*. No entanto, ainda faltam melhorias no que diz respeito à sensibilidade e especificidade, uma vez que a variação da resposta humoral observada em humanos é muito grande (Kunnath-Velayudhan *et al.*, 2010; Kunnath-Velayudhan e Gennaro, 2011).

Métodos moleculares baseados na detecção de ácidos nucleicos podem ser usados em amostras clínicas, apresentando uma maior confiabilidade nos casos em que as amostras de escarro são provenientes de pacientes não tratados e com a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (Hughes *et al.*, 2012). Entretanto, são métodos caros e que podem ter baixo desempenho em condições de campo. Além disso, resultados positivos ainda podem ser observados após tratamento dos pacientes devido a presença residual de DNA, o que não seria adequado em pessoas com histórico de TB ou para monitorar a resposta ao tratamento (Hughes *et al.*, 2012). Outra abordagem utilizada é a imunohistoquímica através do uso de anticorpos específicos. Essa técnica tem o potencial de revelar a presença de antígenos do *M. tuberculosis* em tecidos que apresentam reações histopatológicas características de infecção e pode ser utilizada para melhorar o diagnóstico da TB (Mustafa *et al.*, 1999; Ulrichs *et al.*, 2005). Em adição, já foi demonstrado o potencial de se utilizar um anticorpo contra o antígeno secretado MPT64, que é específico para espécies pertencentes ao complexo do *M. tuberculosis*, para discriminar infecção causada por micobactérias atípicas (Mustafa *et al.*, 2006).

O teste da tuberculina pode ser usado para identificar indivíduos infectados latentemente com *M. tuberculosis*. A mistura complexa de antígenos é injetada intradermicamente podendo causar uma reação de hipersensibilidade tardia. Após 48-72 horas, o diâmetro no local da reação é medido, sendo considerados reatores fortes aqueles que apresentarem um diâmetro igual ou superior a 10 mm. No entanto, esse teste é pouco sensível na diferenciação de indivíduos vacinados daqueles infectados latentemente. Por outro lado, testes mais sensíveis e específicos já estão disponíveis no mercado. Um dos testes avalia a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T em resposta a dois antígenos específicos secretados de *M. tuberculosis*, a saber: ESAT-6 ou “*early secretory antigenic target-6*” e CFP-10 ou “*culture filtrate protein-10*” (Doherty *et al.*, 2002). É bem estabelecido que esse teste discrimina

melhor indivíduos infectados latentemente daqueles com reações cruzadas devido à infecção com micobactérias atípicas ou vacinados com *M. bovis* BCG (Brock *et al.*, 2001). Outros dois testes comerciais disponíveis são o QuantiFERON e o T SPOT-TB que usam a ESAT-6 e CFP-10 como substratos. Entretanto, tais testes não são capazes de identificar aqueles indivíduos que apresentam risco maior de desenvolver ou progredir para um quadro clínico de TB ativa (Kunnath-Velayudhan e Gennaro, 2011).

A prevenção e o controle da TB é sem dúvida dependente de métodos profiláticos eficazes. A vacinação com BCG, contudo, é a única forma disponível, sendo que mais de 3 bilhões de pessoas já foram vacinadas no mundo nos últimos 90 anos (Kaufmann, 2011). Ainda assim, a redução da incidência da TB ou mesmo a sua eliminação constituem um grande desafio de saúde pública. A vacinação com BCG protege de forma eficiente crianças contra a forma miliar da doença. Entretanto, em adultos o nível de proteção pode variar de 0 a 80% (Fine, 1995; Aronson *et al.*, 2004). O estudo conduzido nos Estados Unidos por Aronson e colaboradores em 2004 demonstrou que a vacinação com BCG ainda teve um efeito protetor mesmo após 60 anos, sugerindo que a mesma pode promover uma proteção de longa duração. Outros estudos indicaram que a revacinação com *M. bovis* BCG não apresentou um efeito protetor adicional (Cohn, 1997; Rodrigues *et al.*, 2005), o que demonstra que esta vacina não é suficiente para o controle global da TB e que novas vacinas são necessárias. Apesar dessas variações observadas, a tendência não é de substituição da BCG e sim o seu melhoramento. Uma das alternativas promissoras iniciada há alguns anos atrás foi o desenvolvimento de uma BCG recombinante expressando a listeriolisina, uma proteína secretada de *Listeria monocytogenes* envolvida em eventos de acesso ao citoplasma da célula do hospedeiro (Kaufmann, 2011; Carrero e Unanue, 2012). Outros candidatos vacinais introduzidos são baseados na expressão aumentada de antígenos imunodominantes, como o antígeno 85B, em BCG ou BCG recombinante expressando citocinas (Murray *et al.*, 1996; Horwitz *et al.*, 2000). Em adição, já foi demonstrado experimentalmente que o uso da estratégia “prime-boost” pode ajudar a prevenir a TB (Mcshane e Hill, 2005). Essa estratégia consiste na utilização de uma vacina em conjunto com a BCG, mas num momento posterior. Essas vacinas são representadas, por exemplo, pelo vírus Vaccinia expressando o antígeno 85A (Mcshane *et al.*, 2004), vacinas de DNA (Tollefsen *et al.*, 2002; Huygen, 2005) ou vacinas de subunidades codificando proteínas de fusão (Skeiky *et al.*, 2004; Andersen e Doherty, 2005) como ESAT-6 e

o antígeno 85B (Olsen *et al.*, 2004). Atualmente, 12 candidatos vacinais estão em ensaios clínicos, sendo importante notar que tais candidatos representam proteínas secretadas do *M. tuberculosis* (Kaufmann, 2011).

### **1.5 Identificação de fatores determinantes do *Mycobacterium tuberculosis* na sua interação com o hospedeiro**

O *M. tuberculosis* é o principal representante das espécies pertencentes ao complexo do *M. tuberculosis*, um grupo de micobactérias relacionadas e de crescimento lento, incluindo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canettii*. Embora os membros do complexo apresentem diferenças fenotípicas e de hospedeiro, a diferença em termos genéticos é mínima (Saint-Ruf e Matic, 2006). Dessa forma, sugere-se que os membros do complexo podem ter se originado de uma população clonal ancestral (Gutierrez *et al.*, 2005). Entretanto, já foi demonstrado por meio de técnicas de hibridização que existem 14 regiões de diferenciação (RDs) variando de 2 a 12.7 kb em tamanho, sendo algumas dessas regiões ausentes ou presentes entre os membros do complexo (Behr *et al.*, 1999; Gordon *et al.*, 1999; Bitter *et al.*, 2009). É oportuno ressaltar que os genes presentes nessas regiões representam candidatos interessantes para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico que podem, por sua vez, diferenciar as espécies, além de permitir um melhor entendimento do papel das proteínas correspondentes na interação do patógeno com o hospedeiro.

O genoma da cepa laboratorial *M. tuberculosis* H37Rv foi sequenciado em 1998 (Cole *et al.*, 1998), seguido pelo sequenciamento do isolado clínico *M. tuberculosis* CDC1551 (Fleischmann *et al.*, 2002) e do *M. bovis* AF2122/97 (Garnier *et al.*, 2003). O genoma completo da cepa H37Rv possui 4.411,529 pares de bases com cerca de 4000 genes (Cole *et al.*, 1998). Análises comparativas iniciais revelaram que 40% dos genes preditos identificados estão envolvidos no metabolismo central e que outros 44% são classificados como hipotéticos conservados, significando que estas sequências apresentam um certo grau de similaridade com sequências de outros microorganismos. Já a porcentagem restante de genes provavelmente é exclusiva de micobactérias. Outro aspecto interessante é que mais do que 20% dos genes do *M. tuberculosis* pertencem à duas diferentes classes que são (1) enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos micólicos e (2) proteínas de função desconhecida, de característica ácida e ricas em glicina, chamadas proteínas PE ou PPE. Ambas as classes de proteínas são importantes para o estabelecimento da infecção e virulência (Marjanovic

*et al.*, 2011; Akhter *et al.*, 2012; Bottai *et al.*, 2012). A disponibilidade de genomas e o desenvolvimento de ferramentas em bioinformática criaram perspectivas de um melhor entendimento da biologia do *M. tuberculosis*, o que pode ter consequências positivas nas áreas de diagnóstico e na identificação de novos alvos para fármacos e vacinas. Desde a publicação do genoma, já foram determinadas experimentalmente a estrutura de 312 proteínas e validados modelos estruturais de 2877 genes preditos (70% do genoma), sendo um passo importante para revelar a função das proteínas codificadas ou os processos nos quais estas participam (Anand *et al.*, 2011). O aprimoramento da bioinformática nos últimos anos e a concomitante evolução das técnicas proteômicas permitiram ainda o estudo das propriedades gerais das proteínas do *M. tuberculosis* e a localização das mesmas nas diferentes frações subcelulares (Bell *et al.*, 2012).

Nos últimos anos o secretoma do *M. tuberculosis* tem sido investigado com interesse particular, uma vez que representam um grupo de proteínas com o potencial de induzir uma resposta imune protetora e portanto para o desenvolvimento de novas vacinas (Aagaard *et al.*, 2011; Van Dissel *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2012). Análises de bioinformática das sequências N-terminais de proteínas purificadas do filtrado de cultura, fração que representa a maioria das proteínas secretadas/exportadas do *M. tuberculosis*, revelaram que grande parte é secretada pela via geral de secreção ou via SEC (De Souza *et al.*, 2011). A via SEC está envolvida no translocamento de proteínas através da membrana plasmática pela identificação do peptídeo sinal e sua clivagem após o evento de secreção (De Souza *et al.*, 2011). Entretanto, nem todas as proteínas são secretadas pela via SEC e proteínas que não apresentam um peptídeo sinal clássico na sequência podem ser secretadas por vias alternativas. Esse é o caso da ESAT-6 que apresenta um sinal para secreção localizado na região C-terminal da sequência (Champion *et al.*, 2006).

O primeiro estudo proteômico realizado com proteínas secretadas de *M. tuberculosis* foi publicado no início da década de 90. Nele, 12 proteínas do filtrado de cultura foram purificadas por cromatografia e caracterizadas parcialmente (Nagai *et al.*, 1991). Após a publicação desse trabalho, poucas proteínas adicionais contendo um peptídeo sinal tipo SEC foram descritas, o que provavelmente refletiu uma limitação das técnicas e metodologias disponíveis na época, além da contaminação com proteínas de outras frações subcelulares (Beatty e Russell, 2000; Mattow *et al.*, 2003). Entretanto, esse quadro tem mudado mais recentemente com uma melhor caracterização do

proteoma do *M. tuberculosis* tanto em termos de identificação de proteínas contendo peptídeos sinais como da localização e classificação de outras proteínas (De Souza *et al.*, 2011; De Souza e Wiker, 2011).

As principais proteínas do filtrado de cultura secretadas pelo *M. tuberculosis* são os antígenos 85A, 85B e 85C, do complexo antigênico 85. Estas proteínas apresentam alto grau de similaridade entre elas e ensaios *in vitro* mostraram que as mesmas estão envolvidas na transferência de ácidos micólicos para trealose, levando a formação de  $\alpha, \alpha'$ -trealose mono-micolato e  $\alpha, \alpha'$ -trealose di-micolato (Belisle *et al.*, 1997; De Souza e Wiker, 2011). Tais componentes são predominantes na parede celular do *M. tuberculosis*, formando uma barreira de permeabilidade que protege a bactéria de efeitos adversos do ambiente e promove uma resistência inata a antibióticos (Riley, 2006). Os antígenos do complexo 85 também interagem com o sistema imune do hospedeiro (Beamer *et al.*, 2011).

As proteínas associadas à membrana possuem um papel essencial em diferentes processos biológicos, tais como interações célula-célula, sinalização celular, transporte de íons e nutrientes, podendo também estar envolvidas em mecanismos de patogenicidade (Pizarro-Cerda e Cossart, 2006; Wang *et al.*, 2008; Leo e Skurnik, 2011). Muitas das proteínas associadas à membrana são ativamente exportadas pela via SEC, sendo que aspectos distintos nas regiões de transmembrana da sequência tornaram possível a identificação das mesmas por métodos computacionais (Krogh *et al.*, 2001). No *M. tuberculosis* já foram preditas mais de 780 proteínas com endereçamento para a membrana, representando cerca de 20% de todas as proteínas hipotéticas (Malen *et al.*, 2011). Sugere-se que grande parte das proteínas integrais são inseridas na camada lipídica através de um canal protéico localizado na membrana denominado “complexo translocon”. Esse complexo é composto por diferentes subunidades, mas o mecanismo exato de como ocorre o endereçamento desse grupo de proteínas e da discriminação daquelas que irão ficar ancoradas somente parcialmente ainda é pouco entendido (White e Von Heijne, 2008; Holland, 2010).

Componentes bacterianos que estão associados a superfície da célula e envolvidos na interação com células do hospedeiro são coletivamente classificados como adesinas. Algumas espécies de bactérias utilizam adesinas específicas, ou lectinas, para se ligar a carboidratos localizados na superfície de tecidos do hospedeiro, facilitando processos de adesão, colonização e invasão (Leo e Skurnik,

2011). A localização celular deste grupo de proteínas é considerada diversa, sendo algumas secretadas como moléculas solúveis ou localizadas intracelularmente (Imberty *et al.*, 2004). Entretanto, a maioria está associada com estruturas presentes na superfície bacteriana. Além disso, lectinas bacterianas e seus ligantes cognatos foram identificados a partir de estudos em que a especificidade foi demonstrada pela capacidade de carboidratos bem definidos em inibir a aglutinação de eritrócitos (Imberty *et al.*, 2004; Tielker *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006)). Dessa forma, no contexto biológico os ligantes com os quais tais lectinas interagem são pouco conhecidos. No caso do *M. tuberculosis*, existe uma lectina caracterizada bioquimicamente (HBHA, “Heparin-binding hemagglutinin”) e descrita como sendo importante no processo de disseminação extrapulmonar e interação com células epiteliais (Locht *et al.*, 2006).

No presente trabalho, nós identificamos uma nova lectina secretada do *M. tuberculosis*, SMTL-13, e avaliamos a resposta imune em pacientes com TB ativa e seu potencial diagnóstico assim como investigamos o papel desta proteína durante a infecção *in vitro* de macrófagos. A hipótese é que lectinas são um grupo de proteínas determinantes na interação do *M. tuberculosis* com células do sistema imune inato ou fagocíticas. Estas proteínas poderiam portanto ser um potencial alvo terapêutico e de diagnóstico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar o potencial diagnóstico do produto codificado pelo gene Rv1419 de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com doença ativa e investigar o papel da proteína correspondente na interação inicial com macrófagos.

### 2.2 Específicos

- Desenvolver e validar um anticorpo monoclonal contra o produto do gene *Rv1419* para estudos de localização subcelular utilizando diferentes frações do *M. tuberculosis*.
- Padronizar e avaliar o potencial de uso do anticorpo monoclonal na detecção *in situ* do produto do gene *Rv1419* em biópsias pleurais de pacientes com tuberculose.
- Descrever o perfil de resposta imunológica humoral em pacientes antes, durante e após o tratamento.
- Gerar um mutante a partir de *M. tuberculosis* H37Rv deficiente no gene Rv1419 e avaliar (i) o crescimento *in vitro* em meio de cultura, (ii) a sobrevivência intracelular das bactérias após infecção em macrófagos da linhagem RAW 264.7 e (iii) a regulação da secreção de TNF- $\alpha$ .

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Salvador, Bahia, Protocolo 219 (CAAE) 2221.0.000.225-06), pelo Núcleo de Pesquisa em Pneumologia do Hospital Especializado Octávio Mangabeira (Salvador, Bahia, Parecer N<sup>o</sup> 01/2007) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (Juiz de Fora, Minas Gerais, UFJF-1495.186.2008). Foram obtidos os consentimentos informados para doação de sangue de todos os pacientes, bem como dos voluntários que participaram do estudo como controles.

#### 3.2 Pacientes

Pacientes com tuberculose pulmonar ativa (n=34) provenientes da Divisão de Doenças Respiratórias da Clínica de Saúde Pública de Juiz de Fora-MG e 11 pacientes do Hospital Octávio Mangabeira-BA, foram selecionados para o estudo. Como critério de inclusão, participaram somente aqueles pacientes em que bacilos ácido-ácido resistentes foram detectados por baciloscopia do escarro, ou que apresentaram cultura positiva além de sintomas clínicos e exames de raio-X sugestivos de doença ativa. Pacientes infectados com o vírus HIV, diabetes, hepatite, hipertensão, gravidez e alcoolismo foram critérios de exclusão. Todos os pacientes incluídos no estudo apresentaram baciloscopia negativa após o tratamento. Indivíduos saudáveis e vacinados com BCG (n=38) representaram o grupo “controle endêmico”, que foi formado por estudantes de Medicina e funcionários da UFJF. Cinco estrangeiros, PPD(-) e não vacinados com BCG, constituíram o grupo “controle não endêmico” e outros seis indivíduos PPD(-) e vacinados com BCG foram incluídos no grupo controle, sendo que os mesmos não apresentavam histórico de infecção por *M. tuberculosis*.

#### 3.3 Análise *in silico*

As proteínas anotadas como hipotéticas ou de função desconhecida no genoma do *M. tuberculosis* foram filtradas e comparadas localmente a um banco de dados não redundante de lectinas por meio de um script PERL. A sequência do produto do gene *Rv1419* foi estruturalmente analisada usando o programa proteômico ExPASy (Expert Protein Analysis System) (Gasteiger *et al.*, 2003). O servidor SignalP 3.0 foi utilizado para identificar possíveis peptídeos sinais tipo-

SEC e sítios de clivagem. Além disso, o programa CLUSTALW foi usado para comparar diferentes sequências (Notredame *et al.*, 2000). Por último, o servidor BLAST, que encontra-se disponível no site do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foi utilizado para busca de sequências similares e domínios conservados.

### 3.4 Extração de DNA genômico

O método utilizado para extração do DNA genômico foi o 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 (*ependorfs*) 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 lizozima (concentração final 1 mg/mL), 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 6 µL de proteinase K 10 mg/mL 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*-acetil-*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 microcentrifuga. A fase superior aquosa contendo o DNA foi transferida para novo tubo sendo adicionado 0,6 volumes 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 foi dissolvido em 20 µL com 0,1× tampão TE (1 mM Tris-HCl e 0,1 mM EDTA pH 8 e estocado em freezer -20°C). Para estimar a quantidade do DNA extraído foi medida a absorbância a 260 e 280 nm em espectrofotômetro.

### 3.5 Expressão heteróloga

Um piloto de expressão foi feito para avaliação dos níveis de expressão da proteína em diferentes tempos. Basicamente, o protocolo envolveu a transformação de *E. coli* BL21 (DE3) eletrocompetente com

aproximadamente 20 ng de DNA. Em seguida, as bactérias transformadas foram ressuspensas em 1 mL de meio LB sem antibiótico e transferidas para um tubo *Eppendorf* de 1,5 mL, que foi incubado em shaker (200 rpm) por 30 min a 37°C. Após essa etapa, 500 µL foram transferidos para um tubo falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio LB com antibiótico (Ampicilina 50 µg/mL), sendo incubado por 16 horas a 37 °C sob agitação (pré-inóculo).

O inóculo de indução foi feito com 500 µL do pré-inóculo em 10 mL de meio LB contendo antibiótico (Ampicilina 50 µg/mL). As bactérias foram expandidas até um valor de DO<sub>600</sub> entre 0,5-0,8 (aproximadamente 2 horas). Em seguida, a cultura foi dividida em dois tubos falcon de 50 mL, sendo que um foi utilizado como controle negativo e o outro submetido a indução com 1mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo-IPTG (5 µL de IPTG 1 M para 5 mL de meio LB). Coletas de 500 µL foram realizadas nos tempos de 0-5 horas após a indução. As alíquotas da cultura foram centrifugadas por 10 min a 5000 rpm e o *pellet* e o sobrenadante foram separados para análises em SDS-PAGE. Após a análise dos níveis de expressão, o experimento foi realizado novamente com um volume maior (2 L de cultura) para a produção em escala da proteína recombinante, considerando o tempo determinado pelo experimento piloto.

### 3.6 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 à 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 com a solução de

lise antes de passar no HPLC (Sistema ÄKTA–Amersham). As amostras foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou passadas no filtro de  $0,45\ \mu\text{m}$  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.

### 3.7 Ensaio de hemaglutinação

O ensaio de hemaglutinação para a proteína recombinante sMTL-13 foi testado frente a células sanguíneas de coelho, incubando-se diferentes concentrações da solução da proteína recombinante ( $2,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) com igual volume de suspensão 2% de eritrócitos de coelho, tratados ou não tratados com enzimas proteolíticas (papaína e tripsina), em tubos de ensaio em triplicata. Em seguida, as amostras foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min e deixadas a temperatura ambiente por 16 horas. A atividade hemaglutinante de cada amostra foi avaliada visualmente e registrada em câmera digital.

### 3.8 Frações micobacterianas

Diferentes frações subcelulares do *M. tuberculosis* H37Rv foram usadas. Lisado celular total (WCL), filtrado de cultura (CFP), membrana (M) e parede celular (CW) foram obtidos através de um contrato entre o Prof. Dr. André Báfica (UFSC-NIH) e a *Colorado State University* (*TB vaccine testing and research material*).

### 3.9 Geração do anticorpo monoclonal

Camundongos da linhagem Balb/c foram imunizados i.p. com a proteína recombinante (rRv1419;  $4 \times 20\ \mu\text{g}$ ) na presença do adjuvante AluGel, recebendo em seguida uma injeção i.v. com a rRv1419 ( $20\ \mu\text{g}$ ) em intervalos semanais. Esplenócitos foram isolados e fusionados com células de mieloma Ag8XP3653 (fornecidas pelo Prof. Carlos Zanetti/UFSC) na razão 5:1 usando polietilenoglicol 50% como agente de fusão. As células foram então semeadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen, Brasil) suplementado com 20% de SBF (Hyclone, USA),

sendo que os hibridomas foram selecionados usando 0,1 mM de hipoxantina, 0,4 mM de aminopterina e 0,016 mM de timidina. Os sobrenadantes dos hibridomas foram avaliados por ELISA, usando a proteína recombinante rRv1419 como antígeno de captura. Dos 900 clones inicialmente avaliados, 12 clones foram positivos e selecionados com base na produção de altos títulos de anticorpo contra a rRv1419. Após essa etapa, um clone foi subclonado por diluição limitante, sendo que a classe Ig e subclasse foram determinadas como sendo IgG1 $\kappa$  por meio do sistema SBA Clonotyping/HRP (Southern Biotech, USA). O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná aprovou o protocolo de estudo (23075.031314/2008-41), sendo o experimento conduzido em colaboração com o Dr. Juliano Bordignon do Instituto Carlos Chagas-FIOCRUZ em Curitiba, Paraná.

### **3.10 Marcação de *Mycobacterium tuberculosis* com o anticorpo anti-Smt113**

Uma alíquota de 100  $\mu$ L proveniente de uma suspensão de *M. tuberculosis* H37Rv ( $3 \times 10^8$  células/mL) foi centrifugada em placa de 96 poços fundo “U”. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com 200  $\mu$ L de tampão PBS, centrifugando entre as lavagens. Após a etapa de lavagens, as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de sobrenadante do anticorpo monoclonal anti-SMTL-13 (276.B7) e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. A etapa de lavagem foi repetida e as células incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG murino conjugado com FITC (1:2000) num volume final de 100  $\mu$ L. As células foram lavadas novamente e então fixadas em formalina 4% a 4°C antes de serem usadas no experimento de citometria de fluxo.

### **3.11 Detecção de anticorpos contra SMTL-13 por ELISA**

Microplacas de poliestireno (Biosystems, Brasil) foram incubadas por 16-18 horas a 4°C com a SMTL-13 (5  $\mu$ g/mL) diluída em 0,06 M de tampão carbonato (pH 9.6). Em seguida, as microplacas foram bloqueadas, lavadas e incubadas com os sobrenadantes de cultura dos hibridomas por 40 minutos a 37°C. As placas foram então incubadas com anti-IgG murino conjugado com HRP (SC Biotechnology, USA) na proporção 1: 1200 por 40 minutos a 37°C. O desenvolvimento da reação foi realizada pela adição de ABTS® como substrato (KPL, USA). A reação foi parada pela adição de 10% SDS seguido da leitura da

densidade óptica a 405 nm numa leitora de ELISA (Molecular Devices, USA).

### **3.12 Detecção da SMTL-13 por *western blotting***

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada aplicando-se proteínas totais do *M. tuberculosis* (10 ou 50 µg por poço). Após a transferência para a membrana de nitrocelulose, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com tampão de bloqueio (Tris-HCl pH 7.4 NaCl 150 mM contendo 5% de leite desnatado Molico® e 0,1% Tween-20) por 2 horas a 25°C. Após lavagem, a membrana foi incubada com sobrenadante monoclonal anti-SMTL-13 (Clone 276.B7/IgG1κ) ou anti-19 KD (Clone IT-19; fornecido pelo Dr. Antônio Rothfuchs por meio do contrato NIH/NIAID-TVTRM) na proporção de 1:1000 seguido pela incubação com anticorpo secundário conjugado com HRP (1:2000). A detecção foi realizada por quimioluminescência (Pierce, USA).

### **3.13 Análise imunohistoquímica**

Cortes histológicos pulmonares provenientes de pacientes com TB pleural ou de pacientes com leprose foram desparafinizados em xileno e hidratados em álcool e água. A supressão da atividade de peroxidases endógenas foi realizada com uma solução de metanol contendo 1,5% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos. As secções de tecido foram então incubadas com soro de carneiro normal por 30 minutos a 37°C seguido de incubação com o sobrenadante monoclonal anti-sMTL-13 (clone 276.B7). Após essa etapa, os tecidos foram incubados com anti-IgG murino biotilado e com o complexo streptavidina-HRP (Vectastain Elite ABC reagent, Vector Laboratories, CA, USA) por 30 minutos a 37°C. As reações positivas foram detectadas com 3,3'-diaminobenzidina (Dako Cytomation, USA) seguidas pela contracoloração com hematoxilina de Harris. As secções foram examinadas microscopicamente e as imagens foram geradas usando uma camera digital Sight DS-5M-L1 (Nikon, Melville, NY, USA) conectada ao microscópio de luz Eclipse 50i (Nikon).

### **3.14 Quantificação dos títulos de IgG anti-SMTL-13**

Placas Maxsorb (Nunc, Dinamarca) foram sensibilizadas com a proteína recombinante em tampão carbonato por 16h a 4°C. As placas foram lavadas com PBS-Tween-20 0,05%. Os soros dos pacientes e indivíduos controles foram diluídos na proporção de 1:20 em PBS-

Tween-20 0,05% contendo 10% de soro de carneiro, sendo em seguida incubados por 1 hora a 37°C. As placas foram então lavadas e incubadas com anti-IgG humano conjugado com HRP (Sigma, USA) na proporção de 1:3000. O substrato da reação foi preparado adicionando-se OPD (0.5 mg/mL) em tampão citrato de sódio (pH 5.0) e 0,03% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi usado para desenvolver a reação colorimétrica. A reação foi parada com 2 M de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a densidade óptica lida a 492nm numa leitura de ELISA (Spectramax, Molecular Devices).

### **3.15 Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)**

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. Essas CMSP 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 x 10<sup>6</sup> células por mL para o ensaio de re-estimulação *in vitro* e secreção de IFN- $\gamma$ .

### **3.16 Re-estimulação *in vitro* de secreção de IFN- $\gamma$**

As células foram cultivadas em placas de 48 poços em volume de 0,5 mL, contendo 3 x 10<sup>6</sup> CMSP por mL, em meio RPMI 1640 completo. Estas foram incubadas com Polimixina B 20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 30 min previamente à adição dos estímulos. A dose utilizada de rec-sMTL-13 para a re-estimulação *in vitro* foi de 10  $\mu$ g/mL. Após 48 horas de estímulo os sobrenadantes de cultura foram coletados para análise da secreção de IFN- $\gamma$  por meio de CBA (*Cytokines Beads Assay BD Biosciences*) seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.17 Geração de uma cepa de *Mycobacterium tuberculosis* deficiente para o gene *Rv1419*

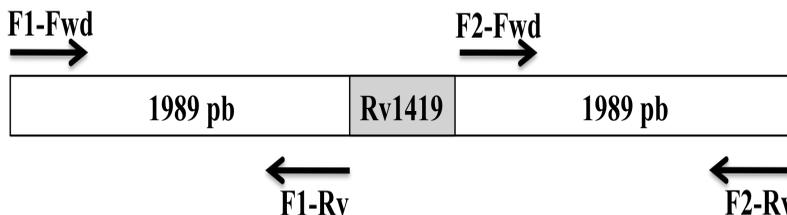
O método utilizado para deleção do gene *Rv1419* foi baseado em substituição alélica por recombinação homóloga (Parish e Stoker, 2000).

#### 3.17.1 Crescimento e manutenção das cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

As cepas de *M. tuberculosis* foram crescidas em meio Middlebrook 7H9 (Difco, MD) contendo 10% de ADC (Becton-Dickinson, MD), 0,2% de glicerol (Fischer Scientific, NJ) e 0,05% de Tween-80 (Fischer Scientific, NJ) ou em meio sólido Middlebrook 7H11 contendo OADC (Becton-Dickinson, MD), 0,5 % de glicerol e 100 µg/mL ciclohexamida (Sigma-Aldrich, USA). A cultura líquida de *M. tuberculosis* foi passada através de um filtro de 5 µm para o preparo de suspensões simples livres de agregados celulares. Este procedimento era realizado para avaliação do crescimento bacteriano e antes da infecção in vitro de macrófagos RAW. No primeiro caso, cepas de *M. tuberculosis* foram crescidas por 21 dias, sendo a densidade óptica (600 nm) mensurada a cada dois dias, para avaliar a cinética de crescimento em condições estáticas. Já no segundo caso, as cepas eram mantidas numa atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### 3.17.2 Construção do vetor

As seqüências nucleotídicas adjacentes à seqüência do gene *Rv1419* foram amplificadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A figura 1 ilustra a região genômica como um exemplo da estratégia de amplificação para obtenção dos fragmentos de interesse deste estudo.



**Figura 1.** Representação esquemática da estratégia utilizada para amplificação das regiões genômicas de interesse. A seqüência do gene *Rv1419* (número de acesso 38490250-NCBI) é mostrada em cinza. A seqüência possui 474 nucleotídeos que codificam para a

proteína hipotética SMTL-13. Os respectivos pares F1 e F2 ilustram os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* (5' e 3') utilizados como iniciadores (*primers*).

A estratégia resumiu-se em utilizar dois pares de *primers* (Primers F1 e F2) complementares às extremidades 5' e 3' das regiões adjacentes ao gene alvo. O DNA genômico, isolado de acordo com van Soolingen (Van Soolingen *et al.*, 1991), foi utilizado como molde para amplificação das respectivas sequências que podem ser checadas no banco de dados genômico do *M. tuberculosis* (código de acesso 41353971 no NCBI). Os oligonucleotídeos F1 e F2 com sítios de restrição para as enzimas *ScaI/HindIII* (F1-Fwd: 5'- ttata **agtact** CGG ATT GCA CAT CATC GAGC - 3'; F1-Rv: 5'- ttata **aagctt** CCG CCA TTC TCT CAT CGT GG - 3') e *HindIII/KpnI* (F2-Fwd: 5'- ttata **aagctt** GCC TGC CCG GCG AAC CCC - 3'; F2-Rv: 5'- ttata **ggtacc** CCC CGA TGA GTC AGG TCG - 3'), respectivamente, foram sintetizados e utilizados na amplificação a fim de facilitar a inserção dentro do vetor de clonagem.

A amplificação via PCR foi realizada em um termociclador PTC-100<sup>TM</sup> empregando-se um volume final de 25 µL constituído de 0,2 µM de cada primer (F1 ou F2), 10 ng de DNA genômico, 0,2 mM de dNTPs, 1 U de Platinum® Taq DNA polymerase High Fidelity. As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização a 62 °C por 30 segundos e extensão dos *primers* a 68 °C por 2 minutos; com extensão final a 68 °C por 8 minutos. Ao término da reação a mesma foi mantida a 4 °C até o momento do uso.

O produto da reação foi analisado aplicando-se 5 µL em gel de agarose a 1% contendo 0,5 µg/mL 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. Os fragmentos de PCR foram subclonados no vetor p2NIL (Parish e Stoker, 2000). Este vetor apresenta um marcador de resistência para canamicina para seleção em *Escherichia coli* e *M. tuberculosis*, uma origem de replicação (*oriE*) em *E. coli*, um sítio múltiplo de clonagem (SMC) e o gene *lacZ* e *sacB* para seleção em placas de cultura. Os mutantes foram gerados em duas etapas. Na primeira etapa, mutantes “*single cross-overs*” (SCO) foram obtidos como resultado da inserção do vetor p2NIL no genoma do *M. tuberculosis* e possuem o fenótipo de resistência à canamicina, colônias de cor azul e sensibilidade a sucrose. Os mutantes SCO obtidos foram

crescidos em meio 7H9 suplementado com ADC e livre de antibióticos por uma semana. Esta etapa permite que a fase final de recombinação homóloga ocorra com a formação dos mutantes “*double cross-overs*” (DCO). Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em placas contendo 2% de sucrose e X-gal para a seleção dos mutantes que perderam o vetor p2NIL do genoma (Figura 2). Colônias brancas foram selecionadas para extração de DNA e a PCR foi realizada para verificação da deleção do gene *Rv1419*. As amostras foram sequenciadas para confirmação da deleção e análise de possíveis mutações pontuais durante os procedimentos de amplificação.

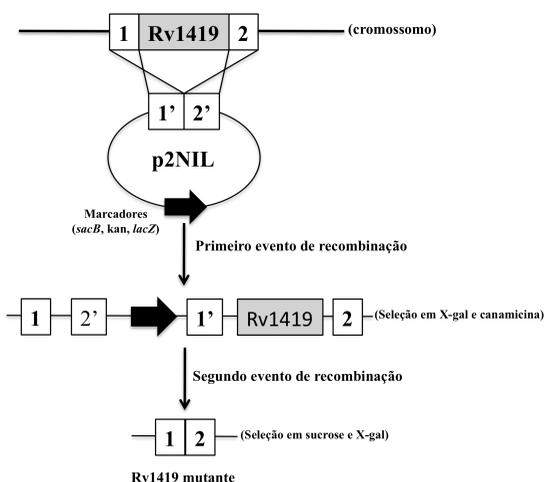


Figura 2. Ilustração da estratégia utilizada para gerar a deleção do gene *Rv1419* de *M. tuberculosis*.

### 3.17.3 Avaliação da sobrevivência intracelular e indução de TNF- $\alpha$ após a infecção de macrófagos RAW 264.7

A linhagem murina RAW 264.7 foi cultivada em meio DMEM (Gibco, NY) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Omega Scientific, CA). Inicialmente, foram plaqueadas  $5 \times 10^5$  células/mL por poço (placa de 24 poços) e incubadas por 16 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com 1 mL de salina estéril para a retirada de células mortas, ou não aderentes, sendo adicionado meio DMEM completo. Os macrófagos foram infectados utilizando-se uma multiplicidade de infecção de 1:1. Após 4 horas de infecção, as células foram lavadas cinco vezes com DMEM para a remoção de bactérias extracelulares. Para examinar a

invasão intracelular, cinética de crescimento e sobrevivência das cepas selvagem e mutante, os macrófagos foram lisados com 1 mL de tampão PBS contendo 0,5% de Triton X-100, sendo feita diluições seriadas do lisado para plaqueamento em meio 7H11. Isto foi feito em diferentes tempos após infecção e as unidades formadoras de colônia foram contadas 21 dias após plaqueamento. Os sobrenadantes das culturas de células infectadas e controles foram usados para avaliar a produção de TNF- $\alpha$ . A concentração de TNF- $\alpha$  no sobrenadante foi determinada por ELISA seguindo as recomendações do fabricante (eBioscience, USA).

### **3.18 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram submetidos aos testes não paramétricos de Mann Whitney, Friedman ou Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn para avaliar se as diferenças entre os grupos eram reais. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0.05$ . Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Uma curva de característica operacional ou ROC foi construída para analisar a acurácia dos valores: área sob a curva, sensibilidade e especificidade.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise *in silico*

Visto a importância que as lectinas apresentam na relação patógeno-hospedeiro, nós desenvolvemos, previamente, um banco de dados não redundante de proteínas relacionadas funcionalmente com lectinas para busca de sequências similares em patógenos de interesse médico. Dessa forma, identificamos uma proteína hipotética codificada pelo gene *Rv1419* no genoma do *M. tuberculosis* H37Rv que possui relação estrutural com lectinas da família das ricinas. A figura 3 mostra a caracterização bioinformática do gene *Rv1419*. O gene é de cópia única e apresenta 474 nucleotídeos, codificando uma proteína de 157 aminoácidos que apresenta um peptídeo sinal tipo SEC e uma massa molecular predita de 16,8 kDa. O peptídeo sinal predito compreende os resíduos 1-33 com um sinal de clivagem tipo I entre os aminoácidos Ala33 e Asp34. A proteína madura possui uma massa molecular aparente de 13,6 kDa. As posições 31 e 32 da sequência primária proteína precursora contém a sequência Ala-x-Ala (o “x” representa qualquer aminoácido), um padrão comumente encontrado que precede o sítio de clivagem (Tuteja, 2005). A proteína hipotética apresenta um domínio lectínico relacionado à cadeia B da ricina presente nos resíduos 33-153, sendo composto por três subdomínios homólogos caracterizados pela presença do padrão Q-W (Hazes, 1996). Estes domínios contendo a cadeia B da ricina ligam-se preferencialmente a glicolídeos e glicoproteínas de superfície contendo moléculas de galactose e manose ligadas em  $\beta$ -1,4 (Hartley e Lord, 2004). Em adição, a pesquisa em banco de dados revelou que o gene *Rv1419* apresenta homólogos conservados na cepa clínica *M. tuberculosis* CDC1551 (número de acesso GenBank: AE000516.2) assim como na cepa vacinal *M. bovis* BCG (número de acesso GenBank: AM408590.1), ambos com 100% de identidade, e 78% de identidade nas espécies *M. marinum* (número de acesso GenBank: CP000854.1) e *M. ulcerans* (número de acesso GenBank: CP000325.1). Esses dados sugerem a existência de uma lectina secretada de *M. tuberculosis* e sequências relacionadas em outras espécies de micobactérias. Com objetivo de aprofundar os estudos sobre possíveis funções do gene *Rv1419*, oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificação, clonagem e expressão da proteína recombinante assim como o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal para estudos de localização em diferentes frações subcelulares do *M. tuberculosis*.

```

1  ATG GGT GAA TTA CGG TTG GTG GGC GGT GTG CTC CGG GTC CTT GTC GTG GTC GGT GCG GTG
1  M G E L R L V G G V L R V L V V V G A V
61  TTC GAT GTG GCG GTG CTA AAC GCC GGT GCG GCT AGT GCC GAC GGC CCG GTC CAG CTG AAG
21  F D V A V L N A G A A S A D G P V Q L K
121 AGC CGA TTG GGC GAT GTT TGC CTG GAC GCC CCG AGT GGG AGC TGG TTC AGC CCG CTG GTG
41  S R L G D V C L (D) A P S G S W F S P L (V)
181 ATC AAC CCC TGC AAT GGG ACC GAC TTT CAG CGC TGG AAT CTC ACC GAT GAC CCG CAG GTC
61  I (N) P C N G T D (F) (Q) R W N L T D D R Q V
241 GAG AGC GTG GCC TTC CCC GGG GAA TGC GTG AAT ATC GGA AAT GCT TTG TG GCG CGC CTG
81  E S V A F P G E C V (N) I G N A L W A (B) L
301 CAG CCC TGT GTG AAC TGG ATC AGC CAG CAC TGG ACT GTC CAG CCC GAC GGC CTG GTC AAG
101 (Q) P C V N W I (S) (Q) H W T V Q P D G L V K
361 AGT GAT CTT GAT GCC TGC CTC ACG GGT CTC GGC GGT CCG GAT CGT GGG ACC TGG GTG TCC
121 S D L D A C L (T) V L G G P D P G T W V (S)
421 ACC CGC TGG TGC GAC CCC AAT GCA CCC GAC CAA CAG TGGGAT AGC GTG CCG TAA
141 T (R) W C D P N A P D (Q) Q W D S V P stop

```

**Figura 3. Análise in silico do gene *Rv1419*.** A proteína predita apresenta um peptídeo sinal composto de 33 aminoácidos com sítio de clivagem entre Ala33 e Asp34. A região entre os resíduos Asp45 e Asp154 representa o domínio lectínico com os prováveis sítios de ligação a carboidratos circulosados. A presença do padrão Q-W está sublinhada.

## 4.2 Expressão heteróloga da proteína SMTL-13

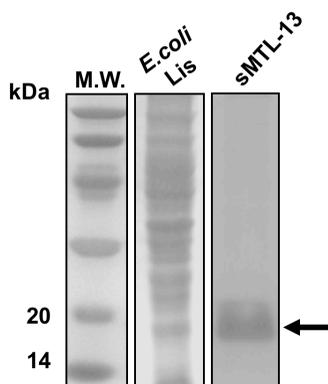
A produção da versão recombinante da SMTL-13 foi realizada pela indução da expressão por IPTG a 37°C sob agitação. Para otimização do tempo de expressão da proteína, alíquotas de 1 mL foram retiradas de hora em hora para avaliar os níveis de expressão nas condições utilizadas e nos tempos escolhidos. Os extratos totais de proteínas de *E. coli* 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.

A presença de uma banda de cerca de 17 kDa nas frações induzidas, tamanho esperado para SMTL-13 contendo o peptídeo sinal, demonstrou o sucesso no protocolo de expressão adotado. Em termos qualitativos, não houve diferenças nos níveis de expressão nos tempos analisados. Entretanto, foi evidenciado que a proteína foi expressa na forma de corpos de inclusão, não sendo observado a presença da mesma na fração solúvel ou no sobrenadante de cultura.

Apesar da obtenção da proteína ter sido 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 posteriores.

### 4.3 Purificação da SMTL-13 por cromatografia de afinidade

As frações insolúveis obtidas das culturas induzidas foram submetidas à cromatografia de afinidade numa coluna contendo níquel imobilizado, sendo que as frações eluídas durante o processo de separação foram analisadas por SDS-PAGE para análise. Inicialmente, algumas das purificações realizadas apresentaram proteínas contaminantes nas frações eluídas. Para eliminar a presença de contaminantes e portanto otimizar o processo de purificação, a estratégia utilizada foi obter as frações eluídas através de um gradiente de imidazol de 0 a 500 mM, uma vez que os contaminantes são eluídos primeiramente à medida que a concentração de imidazol aumenta. Esta abordagem possibilitou a purificação da sMTL-13 recombinante em um único passo cromatográfico. A figura 4 representa um gel SDS-PAGE a 12% obtido após as amostras serem submetidas a eluição com gradiente de imidazol.

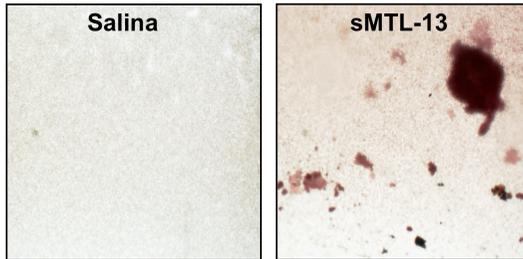


**Figura 4.** Purificação da SMTL-13 recombinante e análise em gel SDS-PAGE 12% corado com azul de coomassie. A primeira coluna representa o marcador de massa molecular. A segunda coluna constitui o lisado total de *E. coli* obtido após o tempo de indução de 4 horas com IPTG. A terceira coluna mostra a sMTL-13 purificada e é representativa das frações eluídas em gradiente de imidazol.

### 4.4 Ensaio de hemaglutinação

A avaliação da atividade hemaglutinante foi empregada para testar a capacidade da sMTL-13 recombinante em induzir aglutinação de hemácias de coelho. De fato, a hemaglutinação foi dependente do tempo, sendo a atividade observada após 16 horas de incubação. Em

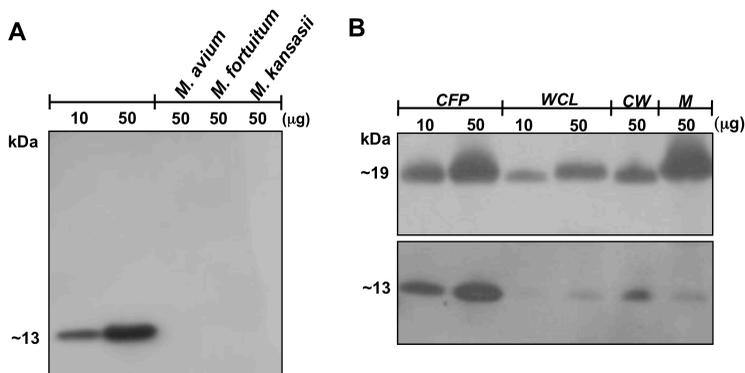
adição, a concentração de 2,5 µg/mL da proteína recombinante foi capaz de aglutinar hemácias tratadas enzimaticamente no mesmo nível observado para as doses de 10 ou 20 µg/mL. Por outro lado, em hemácias normais a dose de 2,5 µg/mL promoveu uma hemaglutinação discreta quando comparada com doses maiores. A figura 5 mostra a atividade hemaglutinante para a sMTL-13 na dose de 10 µg/mL e controle.



**Figura 5. Ensaio de hemaglutinação da sMTL-13 frente a suspensão de 2% de eritrócitos de coelho.** Os eritrócitos foram incubados com salina ou sMTL-13 (10 µg/mL) por 16 horas. As imagens foram geradas em uma câmera digital (aumento 10x). Os dados mostrados são representativos de dois experimentos realizados.

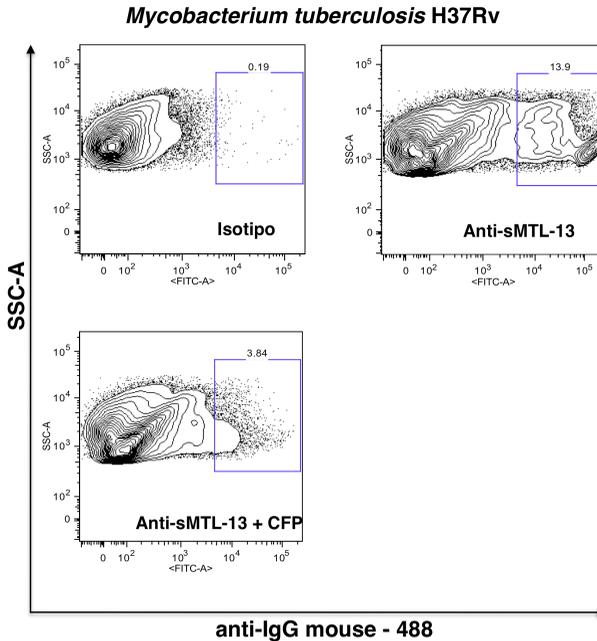
#### 4.5 O produto codificado pelo gene *Rv1419* é ativamente secretado

Um estudo combinando eletroforese bidimensional e espectrometria de massa detectou a presença do produto do gene *Rv1419* na fração do filtrado de cultura (CFP) do *M.tuberculosis* (Malen *et al.*, 2007). A fração CFP apresenta a maioria das proteínas que são secretadas/exportadas *in vitro* pelo bacilo. Para investigar se o produto pode ser encontrado em outras frações subcelulares do *M.tuberculosis*, um anticorpo monoclonal (clone 276.B7/IgG1Kappa) foi gerado contra esta proteína. A figura 6A demonstra por meio de *Western-blot* a presença de uma banda única de cerca de 13 kDa nas preparações de CFP de *M. tuberculosis*, mas a ausência de moléculas imunologicamente relacionadas no CFP de outras micobactérias. Em adição, outras frações do *M. tuberculosis* como o lisado total (WCL), parede celular (CW) e membrana (M) apresentaram uma banda similar de 13 kDa em menores quantidades (Fig 6B). Por outro lado, o antígeno 19 kDa foi detectado nas diferentes frações utilizadas, como demonstrado previamente por outro estudo (Rosenkrands *et al.*, 2000). Esses dados sugerem que o produto do gene *Rv1419* é uma proteína ativamente secretada, pois a mesma se encontra predominantemente no CFP.



**Figura 6. A proteína codificada pelo gene *Rv1419* é detectada na fração CFP de *M. tuberculosis* H37Rv.** (A) Frações CFP de *M. tuberculosis* (10 e 50 µg), *M. avium* (50 µg), *M. fortuitum* (50 µg) e *M. kansasii* foram separadas por eletroforese SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocellulose e o *western-blot* foi realizado utilizando o sobrenadante do anticorpo monoclonal (276.B7); preparações subcelulares de *M. tuberculosis* foram utilizadas e o antígeno 19 kDa (IT-19, diluição 1:1000) foi utilizado como controle de preparação das amostras. Os dados mostrados são representativos de 2 experimentos realizados de forma independente.

É oportuno ressaltar novamente que a sMTL-13 foi detectada em menores proporções na fração da parede celular como mostrado na figura 6B (CW). Entretanto, para descartar a possibilidade de contaminação durante o processo de preparação desta fração, foi realizado um experimento de citometria de fluxo para responder se a sMTL-13 poderia estar associada também a parede celular. De fato, existe uma população de *M. tuberculosis* que expressa a proteína a nível de superfície celular (Figura 7). Além disso, como prova de conceito, foi observado uma redução da fluorescência de marcação quando o anticorpo anti-sMTL-13 foi previamente incubado com a fração CFP de *M. tuberculosis* (Figura 3).

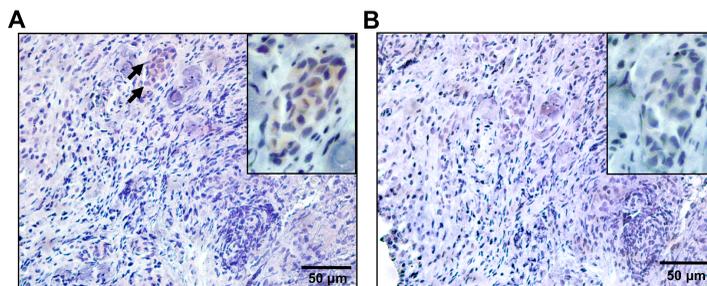


**Figura 7. Citometria de fluxo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv marcado com o anticorpo monoclonal anti-sMTL-13.** Ambos os eixos representam medidas de fluorescência, sendo que o eixo “y” refere-se ao parâmetro de granulidade (SSC) e o eixo “x” refere-se a marcação feita com anticorpo anti-IgG conjugado com FITC. O resultado mostrado é representativo de três experimentos independentes.

#### **4.6 SMTL-13 é detectada in vivo durante a fase ativa da tuberculose em humanos**

Uma vez demonstrada a presença da sMTL-13 no CFP de *M.tuberculosis in vitro*, o próximo passo foi investigar se esta proteína poderia estar sendo expressa durante uma infecção ativa em humanos. Para tal propósito, foram utilizadas três biópsias pleurais de pacientes com tuberculose pleural ativa para realização de imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-sMTL-13 (276.B7). Como demonstrado na figura 8A, foi observado marcação positiva para a sMTL-13 em áreas de granuloma, sendo o padrão de marcação do tipo intracelular em células que provavelmente são macrófagos. Em contraste, o mesmo não foi observado quando um controle negativo utilizando um anticorpo monoclonal isotipo (IgG1) foi testado (fig. 8B), sugerindo especificidade dos resultados observados. Controles adicionais foram testados tais como biópsias pleurais de pacientes com

câncer, biópsias de pele de pacientes com lepra e tecidos com granulomas associados com infecção fúngica, não sendo observado marcação positiva (Nogueira *et al.*, 2010).

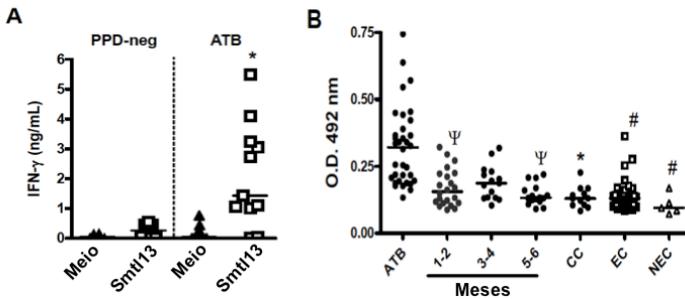


**Figura 8. Marcação *in situ* para sMTL-13 em pacientes com tuberculose ativa.** Imunohistoquímica representativa de três biópsias pleurais com característico infiltrado inflamatório (aumento 400x); (A) marcação positiva para SMTL-13 (painel superior direito, aumento 1000x); (B) controle negativo para isotipo IgG1 (painel superior direito, aumento 1000x).

#### 4.7 SMTL-13 induz uma resposta imune celular e humoral em pacientes com tuberculose ativa

Antígenos secretados pelo *M.tuberculosis* são considerados como alvos preferenciais do sistema imune, uma vez que estão localizados idealmente na interface da interação do patógeno com o hospedeiro (Digiuseppe Champion e Cox, 2007; Ohol *et al.*, 2010). Além disso, estudos de *knockout* gênico em *M. tuberculosis* têm demonstrado a importância de algumas proteínas secretadas durante o estabelecimento da infecção e sobrevivência de animais em modelos experimentais, sugerindo um papel central desse grupo de proteínas na imunopatogênese da tuberculose (Stanley *et al.*, 2007; Ohol *et al.*, 2010). Dessa forma, e estendendo-se as observações anteriores, o presente trabalho investigou se a sMTL-13 é reconhecida durante a fase ativa da doença agora em termos de produção de marcadores de ativação imunológica. Num primeiro momento, foi avaliado a produção de IFN- $\gamma$  em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com tuberculose (n=11) e controles sadios vacinados com *M. bovis* BCG (n=6) após estimulação *in vitro* com sMTL-13. Como pode ser observado na figura 9A, sMTL-13 foi capaz de induzir a secreção de IFN- $\gamma$  em CMSP de pacientes quando comparado ao grupo controle. A segunda abordagem utilizada foi a avaliação da produção de IgG total no soro de pacientes (n=34) antes, durante e depois do tratamento e de controles sadios (n=38) por meio de ELISA. Esse tipo de análise

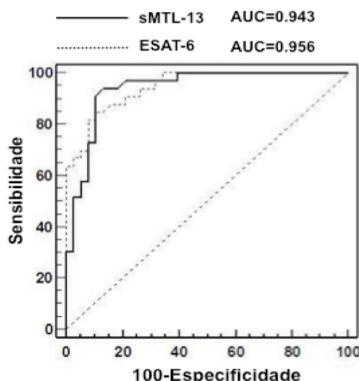
permitiu avaliar a resposta específica anti-SMTL-13 durante a evolução do tratamento. A figura 9B demonstra que pacientes com diagnóstico de TB (grupo ATB, pacientes que ainda não iniciaram o tratamento convencional ou aqueles que já estão sendo tratados por cerca de 15 dias após o diagnóstico) apresentaram altos títulos de IgG total anti-SMTL-13. Esse padrão de resposta rapidamente decresceu após 1-2 meses de tratamento, o que correlacionou com a negatização ou não detecção do bacilo no escarro após esse período e apresentou níveis similares aos dos controles endêmicos (EC) e não endêmicos (NEC) utilizados. Em adição, os níveis de IgG total permaneceram basais durante os quatro meses seguintes de terapia até os pacientes apresentarem cura clínica (CC).



**Figura 9. Resposta imune adaptativa induzida contra SMTL-13 durante a tuberculose ativa em humanos.** (A) CMSP provenientes de indivíduos saudios (n=6) e pacientes com ATB (n=11) foram estimuladas *in vitro* com SMTL-13 purificada (10 mg/mL) por 48 horas. A produção de IFN-g foi detectada no sobrenadante de cultura por CBA (“cytometric beads array”, BD). \* Indica diferença significativa dos grupos independentes estimulados com SMTL-13 ( $p=0.0238$ , Teste Mann-Whitney); (B) Soro de indivíduos saudios (controles endêmicos-EC e não endêmicos-NEC) e de pacientes com ATB foram utilizados para análise da produção de IgG total específica contra SMTL-13 por ELISA. A barra representa a mediana dos valores. # Indica diferença significativa entre os grupos ATB e EC ou NEC ( $p<0.001$ , Teste Kruskal-Wallis).  $\Psi$  Indica diferença significativa entre os grupos ATB e os grupos de pacientes em tratamento ( $p<0.01$ , Teste de Friedman). \* Indica diferença significativa entre os grupos ATB e CC ( $p<0.001$ , Teste de Friedman).

A partir desses dados foi possível definir o potencial da sMTL-13 em diagnosticar o estado de doença ativa baseado na análise de curvas ROC (curva de característica operacional) do título de anticorpos. Para essa análise, um outro antígeno secretado de *M. tuberculosis*, ESAT-6, foi utilizado como controle. Embora ainda não seja conhecida a função da ESAT-6 (“The 6 kDa early secreted antigenic target”) durante a infecção, é uma proteína sabidamente envolvida em

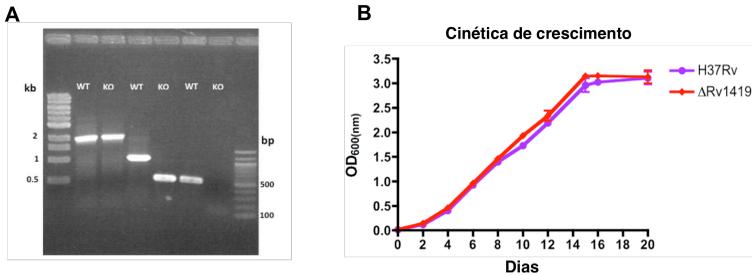
mecanismos de virulência pelo *M. tuberculosis* e que já faz parte de testes de diagnóstico para TB (REECE & KAUFMANN, 2008). Como demonstrado na figura 10, o título de anticorpos contra SMTL-13 apresentou alta especificidade (90%) assim como sensibilidade (93%) para o diagnóstico de TB. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre as áreas sob a curva para a ESAT-6 (AUC=0.956, IC 95%: 0.865-0.985) e a SMTL-13 (AUC=0.943, IC 95%: 0.855-0.981). Dessa forma, esses dados sugerem que uma resposta imune adaptativa é induzida contra a SMTL-13 durante a TB ativa em humanos e que a resposta de anticorpos decai após controle terapêutico do crescimento do *M. tuberculosis*.



**Figura 10.** Análise de curvas ROC anti-SMTL-13 vs. Anti-ESAT-6. Baseado nos títulos de IgG contra SMTL-13 e ESAT-6, considerados como duas variáveis independentes e comparando-se os grupos ATB versus EC, uma curva ROC foi construída para avaliar a acurácia dessas variáveis em diagnosticar ATB. Para cada curva, a sensibilidade foi plotada contra 100-especificidade e a acurácia foi medida pela área sob a curva (AUC).

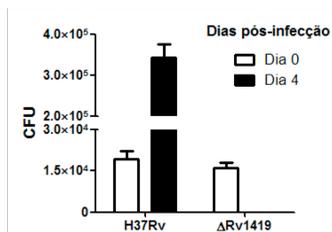
#### 4.8 Geração de uma cepa mutante de *Mycobacterium tuberculosis* deficiente no gene *Rv1419*

A deleção do gene *Rv1419* foi realizada por recombinação homóloga a partir do método descrito por Parish e Stoker (ver metodologia). Após a geração do mutante, nomeado *Mtb-ΔRv1419* (Figura 11A), nós testamos se a mutação teve algum efeito na capacidade da bactéria em crescer em meio líquido 7H9/ADC. Inicialmente, as bactérias foram inoculadas de modo a ter uma OD<sub>600(nm)</sub> de 0,005. O crescimento foi então monitorado por 21 dias seguidos. A figura 11B demonstra que a deleção no gene *Rv1419* não teve efeito na capacidade da bactéria crescer em meio líquido em condições estáticas.

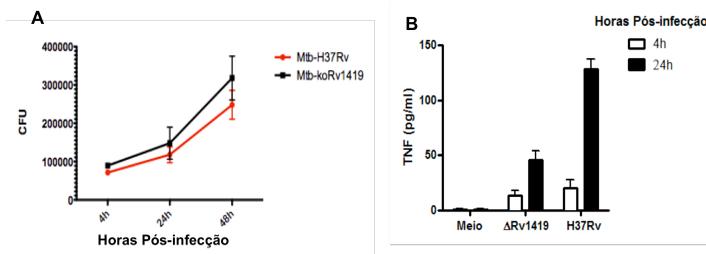


**Figura 11. Reação de PCR para avaliação da deleção do gene *Rv1419* em *Mtb* H37Rv.** Nas colunas 2 e 3 são observadas a presença de uma região genômica comum entre as cepas; nas colunas 4 e 5 observam-se regiões que flanqueiam o gene *Rv1419* e, como esperado, essa região é menor para o mutante; as colunas 6 e 7 representam a amplificação do gene *Rv1419*, não sendo observado para o KO. WT, cepa H37Rv; KO, cepa mutante *Mtb*- $\Delta$ Rv1419. Curvas de crescimento da cepa H37Rv e  $\Delta$ Rv1419 em condições estáticas. Os dados são provenientes de três experimentos independentes.

Em termos de sobrevivência intracelular em macrófagos RAW 264.7, não foi observado diferença no tempo de 4 horas após infecção nas unidades formadoras de colônia (CFU), sugerindo que a deleção do gene *Rv1419* não afetou a taxa de infecção da cepa mutante (Fig. 12). Entretanto, no quarto dia após infecção a diferença entre a cepa parental e mutante foi marcante. Como esperado, há um aumento no CFU para a cepa parental, mas não foi possível recuperar colônias na condição de células infectadas com a cepa mutante. É oportuno ressaltar que a observação direta das células antes da lise das mesmas sugeriu que ao invés da falta de capacidade em sobreviver intracelularmente da cepa mutante, esta parecia estar induzindo morte celular dos macrófagos RAW 264.7 evidenciado pelo alto número de células “despregadas” do fundo da placa. Esse fato também foi observado na condição com a cepa parental, mas numa extensão menor.



**Figura 12. Unidades formadoras de colônia (CFU) nos tempos de 4 horas (Dia 0) e 4 dias após infecção.** Os dados representam uma média de três experimentos independentes.



**Figura 13. Ensaio de sobrevivência intracelular e secreção de TNF- $\alpha$ .** (A) Unidades formadoras de colônia nos tempos de 4, 24 e 48 horas após infecção. Os dados representam uma média de três experimentos independentes; (B) Secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos RAW 264.7 no sobrenadante de cultura de células infectadas. Os sobrenadantes foram coletados nos tempos de 4 e 24 horas e a dosagem de TNF- $\alpha$  foi realizada por meio de ELISA. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes.

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo estudar uma proteína de função desconhecida que é codificada pelo gene *Rv1419* de *M. tuberculosis*. Através da construção de um banco de dados de sequências não redundantes de lectinas de diferentes espécies, foi possível identificar um padrão estrutural relacionado à família das lectinas. Os dados in silico sugerem que a proteína é inicialmente sintetizada como um precursor de 16,8 kDa contendo um peptídeo sinal hidrofóbico de cerca de 33 aminoácidos, sugerindo que a mesma poderia ser endereçada para a membrana ou secretada. Dessa forma, a forma madura seria secretada/exportada e apresentaria uma massa molecular aparente de 13,6 kDa. Entretanto, os dados fornecidos pela bioinformática são hipotéticos e necessitam ser testados experimentalmente. Para testar essa hipótese, fizemos uso da tecnologia do DNA recombinante ou expressão heteróloga de proteínas que promoveu uma revolução nos estudos de estrutura e função de novas proteínas. Isso foi importante para o estudo de sequências hipotéticas do *M. tuberculosis* que é uma bactéria de crescimento lento e que exige um nível 3 de segurança biológica, o que poderia tornar o isolamento de proteínas nativas laborioso e demorado.

O sistema escolhido para expressão heteróloga foi o que utiliza a bactéria *E. coli*. Esse sistema é bem estabelecido por diversos fatores tais como o baixo custo, a rapidez de crescimento em cultura e a reprodutibilidade dos resultados, além de inserir-se no nível 2 de biossegurança. É oportuno ressaltar, entretanto, que algumas proteínas do *M. tuberculosis* necessitam modificações pós-traducionais específicas que a maquinaria de síntese protéica da *E. coli* não é capaz de realizar por questões evolutivas. Essas modificações podem influenciar a atividade biológica da proteína ou mesmo ter um impacto em ensaios que testam a capacidade de um determinado antígeno em induzir ou não um tipo de resposta imunológica. De fato, um trabalho demonstrou que uma lectina de *M. tuberculosis*, HBHA (*heparin-binding hemagglutinin*), precisa ser modificada através de um processo de metilação para induzir proteção em animais desafiados experimentalmente com *M. tuberculosis* virulento, o que não foi observado com a proteína produzida em *E. coli* (Temmerman *et al.*, 2004). Uma alternativa utilizada nesses casos é o uso de outra micobactéria, *M. smegmatis*, como hospedeiro de expressão, uma vez que esta bactéria possui sistemas de processamento pós-traducionais similares. A desvantagem desse sistema é que grande parte dos vetores de expressão disponíveis não são indutíveis, o que pode ser um fator

limitante em termos de produção de quantidades apropriadas de proteína recombinante para ensaios experimentais. No nosso caso, escolhemos o sistema de expressão em *E. coli* pela falta de evidência de que a proteína em estudo apresentasse sítios específicos de modificação pós-traducional. Por outro lado, existem problemas adicionais nesse sistema que são a contaminação com endotoxinas e outras proteínas nas preparações, e a possibilidade de formação de corpos de inclusão. O primeiro caso é crítico para ensaios funcionais de estimulação *in vitro* de células em que resultados falso-positivos podem ser observados. Portanto, devem ser ensaios bem controlados para evitar o mínimo de interferência de contaminantes/endotoxinas. No segundo caso, a produção da proteína na forma insolúvel pode influenciar na atividade biológica da mesma, uma vez que, para realizar o procedimento de purificação, a fração insolúvel é preparada em condições desnaturantes. Foi observado que a proteína de *M. tuberculosis* foi expressa em corpos de inclusão, mas tivemos sucesso no processo de re-solubilização após a purificação por cromatografia de afinidade.

O próximo passo foi testar a capacidade da proteína recombinante em induzir ou não hemaglutinação de eritrócitos de coelho, o que poderia fornecer indícios sobre a preservação da estrutura nativa (ou enovelamento correto) da proteína. De fato, e de acordo com a predição *in silico*, foi observada atividade hemaglutinante, sendo a mesma dependente da dose e do tempo. Embora a especificidade a carboidratos simples não tenha sido determinada por questões de limitação do estoque de proteína, esse dado sugere que a proteína codificada pelo gene *Rv1419* possui relação estrutural com a família das lectinas, além de ter preservado sua atividade biológica. Com o intuito de fornecer informações adicionais sobre o papel desta proteína na interação do *M. tuberculosis* com células do hospedeiro, nós produzimos um anticorpo monoclonal para estudos de localização utilizando diferentes frações subcelulares do bacilo. A análise por meio de *Western-blot* da fração do filtrado de cultura ou CFP de *M. tuberculosis* revelou a presença de uma banda com massa molecular aparente de 13 kDa em níveis similares ao observado para o antígeno 19 kDa, um componente conhecido do CFP (Rosenkrands *et al.*, 2000). Nós passamos então a nomear o produto do gene *Rv1419* de sMTL-13 (do inglês, “*secreted M. tuberculosis lectin of 13 kDa*”). Estes dados estão de acordo com um trabalho que demonstrou a presença da sMTL-13 no CFP através de uma abordagem proteômica (Malen *et al.*, 2007). Por outro lado, uma pequena quantidade da sMTL-13 foi detectada tanto nas frações de parede celular (CW) quanto na de membrana (M), sugerindo

que a mesma pode ser ancorada na superfície celular e depois liberada para o meio extracelular por um mecanismo desconhecido. Para testar essa hipótese, nós realizamos marcação direta do *M. tuberculosis* com o monoclonal 276.B7 e demonstramos por citometria de fluxo que uma população da bactéria (cerca de 13,9%) expressa a proteína na parede celular. Entretanto, qual seria a função da sMTL-13 como proteína de superfície ou secretada é algo que ainda precisa ser melhor definido. Em adição, homólogos para o gene *Rv1419* não foram detectados em outras espécies de micobactérias que podem induzir doença, sendo consistente com os resultados observados quando CFP de *M. avium*, *M. fortuitum* e *M. kansasii* foram utilizados em ensaios de imunodeteção. Por outro lado, o gene *Rv1419* é conservado na cepa vacinal *M. bovis* BCG e, como esperado, foi detectado uma proteína homóloga à sMTL-13 no CFP correspondente (dados não mostrados). É oportuno ressaltar, entretanto, que a obtenção do CFP ocorre em condições ótimas de crescimento *in vitro* e que, portanto, o padrão de expressão para a sMTL-13 pode ser diferente no contexto de uma infecção *in vivo* como exemplificado para a PknG, uma proteína secretada de *M. tuberculosis*, mas que é conservada no genoma de micobactérias não patogênicas (Houben *et al.*, 2009). Portanto, a noção de que um fator de virulência tem que estar ausente no genoma de uma bactéria não virulenta é uma idéia simplificada, uma vez que devem existir mecanismos adicionais de regulação da expressão gênica para esses fatores.

Com a demonstração de que a sMTL-13 é um produto ativamente secretado pelo *M. tuberculosis* em cultura *in vitro*, um passo importante seria demonstrar que a mesma poderia estar sendo expressa *in vivo* durante a fase ativa da TB em humanos. Numa primeira abordagem, utilizamos três biópsias pleurais de pacientes com diagnóstico de TB pleural e fomos capazes de detectar marcação positiva de padrão intracelular em todas as biópsias testadas. Células positivas foram observadas de maneira localizada, principalmente em regiões de granuloma. Apesar de ter sido demonstrado a presença de bacilos álcool-ácido resistentes nas biópsias, foi impraticável estabelecer formalmente que a marcação observada era proveniente de uma célula infectada. Entretanto, podemos afirmar que a marcação foi específica, pois não foi observado células positivas nos controles utilizados que apresentaram padrão de inflamação assim como áreas de granuloma no caso de infecção fúngica. Esses dados sugerem que a utilização do anticorpo monoclonal 276.B7 teria o potencial de ser utilizado em ensaios de triagem para diagnóstico por imunohistoquímica.

Com o objetivo de ampliar os achados de que a sMTL-13 está

sendo expressa durante uma infecção *in vivo*, nós avaliamos a secreção de IFN- $\gamma$  em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) em pacientes com doença ativa e doadores saudáveis sem histórico de TB e PPD(-) na presença deste um antígeno simples. Como esperado, indivíduos sadios não secretam níveis detectáveis de IFN- $\gamma$  quando comparado ao grupo com doença ativa, sugerindo que durante a infecção uma resposta imune adaptativa é gerada contra este antígeno. Na TB ativa, a maioria das células T antígeno-específicas são células efectoras, sendo que as células de memória central são mais frequentes numa infecção latente (Sargentini *et al.*, 2009; Casey *et al.*, 2010). Além disso, o tratamento de pacientes com TB com antibióticos pode promover um decréscimo relativo de células T com fenótipo efector em relação aos de memória, sugerindo que frequências relativas desses tipos celulares estão associadas com mudanças na carga antigênica, como já descrito em infecções virais (Pantaleo e Harari, 2006; Millington *et al.*, 2007; Casey *et al.*, 2010). Ambas populações produzem IFN- $\gamma$ , mas a contribuição das mesmas na produção desta citocina frente a estimulação antigênica com a sMTL-13 não foi investigada no presente estudo. Entretanto, poderia ser um bom indicador da evolução do tratamento baseado no aparecimento de células T com fenótipo de memória.

A maioria dos estudos que envolveram imunidade mediada por linfócitos T na TB focaram num pequeno número de antígenos imunodominantes, já em termos de resposta mediada por linfócitos B os antígenos alvos são dos mais diversos (Kunnath-Velayudhan e Gennaro, 2011). Um trabalho recente avaliou a resposta sorológica de cerca de 500 indivíduos de países onde a TB é endêmica, mostrando que 10% do proteoma do *M. tuberculosis* é capaz de gerar uma resposta de anticorpos (Kunnath-Velayudhan *et al.*, 2010). É importante ressaltar ainda que esta porcentagem envolveu essencialmente proteínas associadas à membrana e proteínas secretadas, sendo que dentro deste grupo menos de 1% é reconhecida pelo soro de pacientes com doença ativa e é formado em sua maioria por proteínas secretadas. Portanto, esses dados sugerem que durante a evolução da infecção para o estado de doença a resposta de anticorpos é um reflexo do estado metabólico da bactéria e que proteínas secretadas seriam os principais alvos do sistema imune.

No presente estudo, demonstramos que pacientes com diagnóstico recente de TB apresentaram altos títulos de IgG anti-sMTL-13 que diminuiriam rapidamente após 1-2 meses de terapia,

permanecendo em níveis basais até os pacientes atingirem cura clínica. Embora alguns estudos, incluindo o nosso, têm mostrado que existe um grau de variabilidade na produção de IgG entre pacientes com TB ativa, o título de anticorpos possui relação direta com a carga bacilar e pode ser utilizado como uma ferramenta para avaliar mudanças relativas de respostas a antígenos bacterianos no curso da infecção (Kunnath-Velayudhan *et al.*, 2010; Kunnath-Velayudhan e Gennaro, 2011). O desafio no campo será utilizar a dinâmica de resposta de anticorpos para fins de diagnóstico. Por outro lado, curvas ROC revelaram que a sMTL-13 possui alta sensibilidade (93%) e especificidade (90%) para o diagnóstico de TB de forma similar ao observado para outro antígeno secretado (ESAT-6) já utilizado em testes de imunodiagnóstico. A partir desses dados, nós especulamos que os títulos de IgG anti-sMTL-13 podem ser utilizados como um biomarcador de sucesso terapêutico. Para validação desta hipótese, entretanto, seria necessário avaliar um número maior de pacientes, incluindo aqueles com falha terapêutica. A validação destes dados seriam de grande relevância para identificação deste grupo de pacientes, fornecendo informações úteis para a escolha do esquema de tratamento e dessa forma melhorando o prognóstico do paciente.

Com o objetivo de colocar os resultados mencionados num contexto biológico, nós investigamos o papel do gene *Rv1419* de *M. tuberculosis* *in vitro*. Por ser um gene de cópia única no genoma, foi possível realizar deleção gênica por recombinação homóloga de forma específica e sem a inserção de mutações pontuais nas regiões que flanqueiam o gene. O nosso sucesso em gerar o mutante revelou que o gene *Rv1419* não é essencial para a viabilidade do *M. tuberculosis*, o que está de acordo com um estudo que fez uma avaliação global de genes essenciais por transposição genética (Sasseti *et al.*, 2003). Entretanto, esta última metodologia não é muito apropriada devido aos potenciais efeitos polares que são característicos da própria técnica, significando que alterações em regiões adjacentes ao gene de interesse podem causar fenótipos não relacionados e portanto interpretações errôneas. De fato, alguns dos genes ditos como essenciais foram posteriormente invalidados por técnicas em que o risco de ocorrer um efeito polar é baixo, como a mutagênese por recombinação homóloga (Marjanovic *et al.*, 2010). Determinar a essencialidade de um gene é crítico para estudos funcionais *in vitro* e *in vivo*, pois caso seja observado deficiências no crescimento *in vitro* comparado à cepa parental torna-se impraticável a análise dos resultados pela falta de normalização dos mesmos. Portanto, não somente mostramos que o

gene não é essencial, mas também que o gene *Rv1419* não afeta a capacidade da bactéria em replicar em meio líquido, como demonstrado pela curva de crescimento em condições estáticas em relação à cepa parental. Por outro lado, o gene *Rv1419* parece afetar a sobrevivência intracelular do mutante após infecção de macrófagos RAW 264.7. No primeiro experimento, mostramos que há uma redução marcante nas unidades formadoras de colônia da cepa mutante no quarto dia após a infecção, mas essa redução parece não ter relação com controle inato do crescimento bacteriano ou por causa de uma deficiência de crescimento intracelular. De fato, foi observado um número maior de células mortas infectadas com a cepa mutante, o que certamente teve um impacto na contagem do CFU. Um segundo experimento foi realizado para avaliar a sobrevivência em tempos mais curtos e, de forma interessante, parece existir uma tendência de maior crescimento da cepa mutante em relação à cepa parental, o que descartaria parcialmente a hipótese de que o mutante estaria induzindo morte celular por alguma via intracelular. Na realidade, as células morreram aparentemente pela falta de controle do crescimento da bactéria, sendo esta idéia corroborada posteriormente pela dosagem de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cultura. Entretanto, poderia ser questionado que uma menor quantidade de TNF- $\alpha$  estaria associada à uma menor quantidade de células. Mas é oportuno ressaltar que 24 horas após a infecção não foi observado diferenças marcantes ao microscópio na viabilidade das células. Em adição, os dados de CFU após quatro horas de infecção sugerem que não houve diferenças no número de bactérias que entraram nas células, o que poderia explicar possíveis diferenças nas contagens em tempos posteriores. Portanto, o reconhecimento inato da sMTL-13 parece ser importante para o estabelecimento de uma infecção intracelular e parece também regular a via de secreção de TNF- $\alpha$ , podendo ser caracterizado como um fenótipo de hipervirulência pelo menos *in vitro*. O TNF- $\alpha$  é crítico para o controle do *M. tuberculosis* em humanos e modelos experimentais, sendo que alterações na sua produção estão associadas com a imunopatogênese da TB (Solovic *et al.*, 2010).

É importante notar que a maioria das mutações ou fenótipos observados num evento de deleção gênica geralmente estão associados à perda da capacidade de causar doença. *Salmonella typhimurium*, por exemplo, possui mais de 200 genes considerados importantes para a virulência da bactéria em um modelo murino de infecção (Bowe *et al.*, 1998). No caso do *M. tuberculosis*, já foram identificados 194 genes como sendo necessários para o estabelecimento da infecção e doença em

modelos experimentais (Sassetti e Rubin, 2003). Entretanto, fenótipos de hipervirulência, embora raros, já foram descritos como resultado de deleções gênicas em *Streptococcus pyogenes*, *Shigella*, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* em que os genes faziam parte de componentes regulatórios envolvidos na produção de produtos tóxicos ou imunomodulatórios (Foreman-Wykert e Miller, 2003). A manutenção dos mesmos provavelmente reflete milhares de anos de co-evolução entre o patógeno e o hospedeiro.

O fenômeno da hipervirulência em *M. tuberculosis* foi descrito primeiramente com relação às diferenças observadas entre isolados clínicos (Lopez *et al.*, 2003; Barczak *et al.*, 2005). Nestes casos, existem diferenças genéticas que podem resultar em maior ou menor virulência. Isso é bem exemplificado nos isolados de *M. tuberculosis* da família Beijing em que a alta virulência é explicada em parte devido ao acúmulo de um glicolípido fenólico na parede celular da bactéria (Reed *et al.*, 2004; Reed *et al.*, 2007). Outras evidências foram demonstradas na cepa laboratorial H37Rv. A primeira observação foi feita em mutantes selecionados a partir de uma biblioteca de transposição genética (Mcadam *et al.*, 2002). Alguns desses mutantes foram escolhidos para infectar camundongos SCID e nos casos severos os animais morreram rapidamente quando comparados com os animais infectados com a cepa parental. Exemplos adicionais de hipervirulência em *M. tuberculosis* têm sido publicados, o que pode ampliar o nosso conhecimento de genes importantes para estabelecimento da infecção assim como um melhor entendimento da biologia da interação patógeno-hospedeiro (Shimono *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2007; Uchida *et al.*, 2007).

A sobrevivência intracelular do *M. tuberculosis* depende da sua capacidade em inibir o processo de maturação do fagossomo, que é usualmente bactericida para outros microorganismos, usando mecanismos que ainda são pouco entendidos, mas que pode envolver proteínas secretadas (Pethe *et al.*, 2004; Walburger *et al.*, 2004). Além disso, a redução da secreção de TNF- $\alpha$  durante a infecção de macrófagos por uma cepa mutante nem sempre está associada a um fenótipo de hipervirulência. Um mutante de *M. tuberculosis* para o gene *Rv0386*, que codifica para uma proteína secretada, promove redução nos níveis de TNF- $\alpha$  tanto *in vitro* como *in vivo* e os animais infectados apresentaram imunopatologia reduzida nos tecidos (Agarwal *et al.*, 2009). Entretanto, os autores não mostraram uma curva de sobrevivência intracelular do mutante após infecção de macrófagos. Dessa forma, o *M. tuberculosis* pode modular a produção de TNF- $\alpha$  e

indiretamente alterar a inflamação no sítio de infecção, criando o ambiente necessário para o seu crescimento e persistência. Se o mesmo ocorre para o gene *Rv1419* é algo que precisa ser investigado *in vivo*. Outro aspecto importante seria a identificação do receptor envolvido no reconhecimento da sMTL-13, o que poderia fornecer evidências das vias intracelulares envolvidas.

Neste estudo, mostramos a existência de uma nova lectina secretada de *M. tuberculosis* que é reconhecida por pacientes com TB ativa em termos de resposta imune celular e humoral. Estas observações sugerem ainda que a sMTL-13 apresenta o potencial como biomarcador de diagnóstico e eficácia terapêutica assim como um alvo para imunização. Ainda importante, os nossos dados preliminares de infecção *in vitro* com uma cepa deficiente no gene *Rv1419* sugerem que o mesmo parece ser importante na regulação da via de secreção do TNF- $\alpha$  e consequentemente no controle do crescimento bacteriano.

## 6 CONCLUSÕES

Os achados desta tese levam as seguintes conclusões:

- O produto codificado pelo gene *Rv1419*, que ainda está anotado no genoma como sendo um gene de função hipotética, apresentou atividade hemaglutinante. Este dado está de acordo com predições *in silico* sobre a presença de domínios de ligação a carboidratos;
- O gene *Rv1419* codifica para uma proteína (sMTL-13) que é ativamente secretada pelo *M. tuberculosis in vitro*;
- O anticorpo monoclonal 276.B7 foi capaz de detectar *in situ* o produto secretado sMTL-13 de *M. tuberculosis* em tecidos;
- A sorologia para mensuração de anticorpos IgG contra a sMTL-13 pode ser uma valiosa técnica que pode ser utilizada como um biomarcador de sucesso terapêutico;
- Baseado na resposta de anticorpos IgG, a sMTL-13 não apresentou diferenças em termos de sensibilidade e especificidade em relação a ESAT-6 na detecção de doença ativa;
- O gene *Rv1419* não é essencial para o crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis*;
- A cepa mutante *M. tuberculosis-ΔRv1419* parece influenciar a secreção de TNF- $\alpha$  e induzir morte celular pela falta de controle do crescimento bacteriano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aagaard, C., T. Hoang, J. Dietrich, P. J. Cardona, A. Izzo, G. Dolganov, G. K. Schoolnik, J. P. Cassidy, R. Billeskov e P. Andersen. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. **Nat Med**, v.17, n.2, Feb, p.189-94, 2011.

Abel, B., N. Thieblemont, V. J. Quesniaux, N. Brown, J. Mpagi, K. Miyake, F. Bihl e B. Ryffel. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **J Immunol**, v.169, n.6, Sep 15, p.3155-62, 2002.

Aderem, A. e R. J. Ulevitch. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v.406, n.6797, Aug 17, p.782-7, 2000.

Agarwal, N., G. Lamichhane, R. Gupta, S. Nolan e W. R. Bishai. Cyclic AMP intoxication of macrophages by a Mycobacterium tuberculosis adenylate cyclase. **Nature**, v.460, n.7251, Jul 2, p.98-102, 2009.

Akhter, Y., M. T. Ehebauer, S. Mukhopadhyay e S. E. Hasnain. The PE/PPE multigene family codes for virulence factors and is a possible source of mycobacterial antigenic variation: perhaps more? **Biochimie**, v.94, n.1, Jan, p.110-6, 2012.

Anand, P., S. Sankaran, S. Mukherjee, K. Yeturu, R. Laskowski, A. Bhardwaj, R. Bhagavat, S. K. Brahmachari e N. Chandra. Structural annotation of Mycobacterium tuberculosis proteome. **PLoS One**, v.6, n.10p.e27044, 2011.

Andersen, P. e T. M. Doherty. TB subunit vaccines--putting the pieces together. **Microbes Infect**, v.7, n.5-6, May, p.911-21, 2005.

Aronson, N. E., M. Santosham, G. W. Comstock, R. S. Howard, L. H. Moulton, E. R. Rhoades e L. H. Harrison. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. **JAMA**, v.291, n.17, May 5, p.2086-91, 2004.

Bafica, A., C. A. Scanga, C. G. Feng, C. Leifer, A. Cheever e A. Sher. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. **J Exp Med**, v.202, n.12, Dec 19, p.1715-24, 2005.

Barczak, A. K., P. Domenech, H. I. Boshoff, M. B. Reed, C. Manca, G. Kaplan e C. E. Barry, 3rd. In vivo phenotypic dominance in mouse mixed infections with Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. **J Infect Dis**, v.192, n.4, Aug 15, p.600-6, 2005.

Beamer, G. L., J. Cyktor, B. Carruthers e J. Turner. H-2 alleles contribute to antigen 85-specific interferon-gamma responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Cell Immunol**, v.271, n.1p.53-61, 2011.

Beatty, W. L. e D. G. Russell. Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages. **Infect Immun**, v.68, n.12, Dec, p.6997-7002, 2000.

Behar, S. M., C. J. Martin, M. G. Booty, T. Nishimura, X. Zhao, H. X. Gan, M. Divangahi e H. G. Remold. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. **Mucosal Immunol**, v.4, n.3, May, p.279-87, 2011.

Behr, M. A., M. A. Wilson, W. P. Gill, H. Salamon, G. K. Schoolnik, S. Rane e P. M. Small. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. **Science**, v.284, n.5419, May 28, p.1520-3, 1999.

Belisle, J. T., V. D. Vissa, T. Sievert, K. Takayama, P. J. Brennan e G. S. Besra. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. **Science**, v.276, n.5317, May 30, p.1420-2, 1997.

Bell, C., G. T. Smith, M. J. Sweredoski e S. Hess. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* proteome by liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics techniques: a comprehensive resource for tuberculosis research. **J Proteome Res**, v.11, n.1, Jan 1, p.119-30, 2012.

Bitter, W., E. N. Houben, D. Bottai, P. Brodin, E. J. Brown, J. S. Cox, K. Derbyshire, S. M. Fortune, L. Y. Gao, J. Liu, N. C. Gey Van Pittius, A. S. Pym, E. J. Rubin, D. R. Sherman, S. T. Cole e R. Brosch. Systematic genetic nomenclature for type VII secretion systems. **PLoS Pathog**, v.5, n.10, Oct, p.e1000507, 2009.

Bottai, D., M. Di Luca, L. Majlessi, W. Frigui, R. Simeone, F. Sayes, W. Bitter, M. J. Brennan, C. Leclerc, G. Batoni, M. Campa, R. Brosch e S. Esin. Disruption of the ESX-5 system of *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation. **Mol Microbiol**, Feb 20, 2012.

Bowe, F., C. J. Lipps, R. M. Tsois, E. Groisman, F. Heffron e J. G. Kusters. At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. **Infect Immun**, v.66, n.7, Jul, p.3372-7, 1998.

Brock, I., M. E. Munk, A. Kok-Jensen e P. Andersen. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.5, n.5, May, p.462-7, 2001.

Cardona, P. J. New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v.6, n.1, Mar, p.27-39, 2007.

Carrero, J. A. e E. R. Unanue. Mechanisms and immunological effects of apoptosis caused by *Listeria monocytogenes*. **Adv Immunol**, v.113p.157-74, 2012.

Casey, R., D. Blumenkrantz, K. Millington, D. Montamat-Sicotte, O. M. Kon, M. Wickremasinghe, S. Bremang, M. Magtoto, S. Sridhar, D. Connell e A. Lalvani. Enumeration of functional T-cell subsets by fluorescence-immunospot defines signatures of pathogen burden in tuberculosis. **PLoS One**, v.5, n.12p.e15619, 2010.

Chambers, M. A., D. Gavier-Widen e R. G. Hewinson. Antibody bound to the surface antigen MPB83 of *Mycobacterium bovis* enhances survival against high dose and low dose challenge. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.41, n.2, Jun 1, p.93-100, 2004.

Champion, P. A., S. A. Stanley, M. M. Champion, E. J. Brown e J. S. Cox. C-terminal signal sequence promotes virulence factor secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v.313, n.5793, Sep 15, p.1632-6, 2006.

Chan, J. e J. Flynn. The immunological aspects of latency in tuberculosis. **Clin Immunol**, v.110, n.1, Jan, p.2-12, 2004.

Cohn, D. L. Use of the bacille Calmette-Guerin vaccination for the prevention of tuberculosis: renewed interest in an old vaccine. **Am J Med Sci**, v.313, n.6, Jun, p.372-6, 1997.

Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. Mclean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead e B. G. Barrell. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v.393, n.6685, Jun 11, p.537-44, 1998.

Cooper, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v.27p.393-422, 2009.

Cooper, A. M., K. D. Mayer-Barber e A. Sher. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunol**, v.4, n.3, May, p.252-60, 2011.

Davies, G. R. e E. L. Nuernberger. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of anti-tuberculosis drugs. **Tuberculosis (Edinb)**, v.88 Suppl 1, Aug, p.S65-74, 2008.

De Souza, G. A., N. A. Leversen, H. Malen e H. G. Wiker. Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway. **J Proteomics**, v.75, n.2, Dec 21, p.502-10, 2011.

De Souza, G. A. e H. G. Wiker. A proteomic view of mycobacteria. **Proteomics**, v.11, n.15, Aug, p.3118-27, 2011.

Dean, G. L., S. G. Edwards, N. J. Ives, G. Matthews, E. F. Fox, L. Navaratne, M. Fisher, G. P. Taylor, R. Miller, C. B. Taylor, A. De Ruiter e A. L. Pozniak. Treatment of tuberculosis in HIV-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. **AIDS**, v.16, n.1, Jan 4, p.75-83, 2002.

Digiuseppe Champion, P. A. e J. S. Cox. Protein secretion systems in Mycobacteria. **Cell Microbiol**, v.9, n.6, Jun, p.1376-84, 2007.

Doherty, T. M., A. Demissie, J. Olobo, D. Wolday, S. Britton, T. Eguale, P. Ravn e P. Andersen. Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. **J Clin Microbiol**, v.40, n.2, Feb, p.704-6, 2002.

Drennan, M. B., D. Nicolle, V. J. Quesniaux, M. Jacobs, N. Allie, J. Mpagi, C. Fremond, H. Wagner, C. Kirschning e B. Ryffel. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to Mycobacterium tuberculosis infection. **Am J Pathol**, v.164, n.1, Jan, p.49-57, 2004.

Espinal, M. e M. C. Raviglione. From threat to reality: the real face of multidrug-resistant tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v.178, n.3, Aug 1, p.216-7, 2008.

Evans, C. A. GeneXpert--a game-changer for tuberculosis control? **PLoS Med**, v.8, n.7, Jul, p.e1001064, 2011.

Feng, C. G., A. G. Bean, H. Hooi, H. Briscoe e W. J. Britton. Increase in gamma interferon-secreting CD8(+), as well as CD4(+), T cells in lungs following aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis. **Infect Immun**, v.67, n.7, Jul, p.3242-7, 1999.

Ferrero, E., P. Biswas, K. Vettoretto, M. Ferrarini, M. Uguccioni, L. Piali, B. E. Leone, B. Moser, C. Rugarli e R. Pardi. Macrophages exposed to Mycobacterium tuberculosis release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gammadelta cells. **Immunology**, v.108, n.3, Mar, p.365-74, 2003.

Fine, P. E. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. **Lancet**, v.346, n.8986, Nov 18, p.1339-45, 1995.

Fleischmann, R. D., D. Alland, J. A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. Deboy, R. Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, L. A. Umayam, M. Ermolaeva, S. L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikula, W. Bishai, W. R. Jacobs Jr, Jr., J. C. Venter e C. M.

- Fraser. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. **J Bacteriol**, v.184, n.19, Oct, p.5479-90, 2002.
- Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart e B. R. Bloom. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Exp Med**, v.178, n.6, Dec 1, p.2249-54, 1993.
- Fontana, M. F. e R. E. Vance. Two signal models in innate immunity. **Immunol Rev**, v.243, n.1, Sep, p.26-39, 2011.
- Foreman-Wykert, A. K. e J. F. Miller. Hypervirulence and pathogen fitness. **Trends Microbiol**, v.11, n.3, Mar, p.105-8, 2003.
- Fox, W., G. A. Ellard e D. A. Mitchison. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.3, n.10 Suppl 2, Oct, p.S231-79, 1999.
- Garnier, T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon e R. G. Hewinson. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.13, Jun 24, p.7877-82, 2003.
- Gasteiger, E., A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel e A. Bairoch. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Res**, v.31, n.13, Jul 1, p.3784-8, 2003.
- Glatman-Freedman, A. The role of antibody-mediated immunity in defense against *Mycobacterium tuberculosis*: advances toward a novel vaccine strategy. **Tuberculosis (Edinb)**, v.86, n.3-4, May-Jul, p.191-7, 2006.
- Goldman, R. C., B. E. Laughon, R. C. Reynolds, J. A. Secrist, 3rd, J. A. Maddry, M. A. Guie, A. C. Poffenberger, C. A. Kwong e S. Ananthan. Programs to facilitate tuberculosis drug discovery: the tuberculosis antimicrobial acquisition and coordinating facility. **Infect Disord Drug Targets**, v.7, n.2, Jun, p.92-104, 2007.
- Gordon, S. V., R. Brosch, A. Billault, T. Garnier, K. Eiglmeier e S. T. Cole. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. **Mol Microbiol**, v.32, n.3, May, p.643-55, 1999.
- Grosset, J., C. Truffot-Pernot, C. Lacroix e B. Ji. Antagonism between isoniazid and the combination pyrazinamide-rifampin against tuberculosis infection in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.36, n.3, Mar, p.548-51, 1992.

Gutierrez, M. C., S. Brisse, R. Brosch, M. Fabre, B. Omais, M. Marmiesse, P. Supply e V. Vincent. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathog**, v.1, n.1, Sep, p.e5, 2005.

Hartley, M. R. e J. M. Lord. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. **Biochim Biophys Acta**, v.1701, n.1-2, Sep 1, p.1-14, 2004.

Hazes, B. The (QxW)<sub>3</sub> domain: a flexible lectin scaffold. **Protein Sci**, v.5, n.8, Aug, p.1490-501, 1996.

Hernandez-Pando, R., M. Jeyanathan, G. Mengistu, D. Aguilar, H. Orozco, M. Harboe, G. A. Rook e G. Bjune. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. **Lancet**, v.356, n.9248, Dec 23-30, p.2133-8, 2000.

Hirsch, C. S., Z. Toossi, C. Othieno, J. L. Johnson, S. K. Schwander, S. Robertson, R. S. Wallis, K. Edmonds, A. Okwera, R. Mugerwa, P. Peters e J. J. Ellner. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. **J Infect Dis**, v.180, n.6, Dec, p.2069-73, 1999.

Holland, I. B. The extraordinary diversity of bacterial protein secretion mechanisms. **Methods Mol Biol**, v.619p.1-20, 2010.

Horwitz, M. A., G. Harth, B. J. Dillon e S. Maslesa-Galic. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.25, Dec 5, p.13853-8, 2000.

Houben, E. N., A. Walburger, G. Ferrari, L. Nguyen, C. J. Thompson, C. Miess, G. Vogel, B. Mueller e J. Pieters. Differential expression of a virulence factor in pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. **Mol Microbiol**, v.72, n.1, Apr, p.41-52, 2009.

Hughes, R., D. Wonderling, B. Li e B. Higgins. The cost effectiveness of Nucleic Acid Amplification Techniques for the diagnosis of tuberculosis. **Respir Med**, v.106, n.2, Feb, p.300-7, 2012.

Huygen, K. Plasmid DNA vaccination. **Microbes Infect**, v.7, n.5-6, May, p.932-8, 2005.

Imberty, A., M. Wimmerova, E. P. Mitchell e N. Gilboa-Garber. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes Infect**, v.6, n.2, Feb, p.221-8, 2004.

Jindani, A., A. J. Nunn e D. A. Enarson. Two 8-month regimens of chemotherapy for treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis: international multicentre randomised trial. **Lancet**, v.364, n.9441, Oct 2-8, p.1244-51, 2004.

Jones, B. W., T. K. Means, K. A. Heldwein, M. A. Keen, P. J. Hill, J. T. Belisle e M. J. Fenton. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. **J Leukoc Biol**, v.69, n.6, Jun, p.1036-44, 2001.

Karyadi, E., C. E. West, W. Schultink, R. H. Nelwan, R. Gross, Z. Amin, W. M. Dolmans, H. Schlebusch e J. W. Van Der Meer. A double-blind, placebo-controlled study of vitamin A and zinc supplementation in persons with tuberculosis in Indonesia: effects on clinical response and nutritional status. **Am J Clin Nutr**, v.75, n.4, Apr, p.720-7, 2002.

Kaufmann, S. H. Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. **Lancet Infect Dis**, v.11, n.8, Aug, p.633-40, 2011.

Keane, J., S. Gershon, R. P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W. D. Schwieterman, J. N. Siegel e M. M. Braun. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. **N Engl J Med**, v.345, n.15, Oct 11, p.1098-104, 2001.

Kliiman, K. e A. Altraja. Predictors of poor treatment outcome in multi- and extensively drug-resistant pulmonary TB. **Eur Respir J**, v.33, n.5, May, p.1085-94, 2009.

Krogh, A., B. Larsson, G. Von Heijne e E. L. Sonnhammer. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **J Mol Biol**, v.305, n.3, Jan 19, p.567-80, 2001.

Kunnath-Velayudhan, S. e M. L. Gennaro. Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery. **Clin Microbiol Rev**, v.24, n.4, Oct, p.792-805, 2011.

Kunnath-Velayudhan, S., H. Salamon, H. Y. Wang, A. L. Davidow, D. M. Molina, V. T. Huynh, D. M. Cirillo, G. Michel, E. A. Talbot, M. D. Perkins, P. L. Felgner, X. Liang e M. L. Gennaro. Dynamic antibody responses to the Mycobacterium tuberculosis proteome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.107, n.33, Aug 17, p.14703-8, 2010.

L'homme R, F., H. M. Nijland, L. Gras, R. E. Aarnoutse, R. Van Crevel, M. Boeree, K. Brinkman, J. M. Prins, J. R. Juttman e D. M. Burger. Clinical experience with the combined use of lopinavir/ritonavir and rifampicin. **AIDS**, v.23, n.7, Apr 27, p.863-5, 2009.

Lawn, S. D., L. G. Bekker e R. F. Miller. Immune reconstitution disease associated with mycobacterial infections in HIV-infected individuals receiving antiretrovirals. **Lancet Infect Dis**, v.5, n.6, Jun, p.361-73, 2005.

Leo, J. C. e M. Skurnik. Adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia*. **Adv Exp Med Biol**, v.715p.1-15, 2011.

Lienhardt, C., A. Vernon e M. C. Raviglione. New drugs and new regimens for the treatment of tuberculosis: review of the drug development pipeline and implications for national programmes. **Curr Opin Pulm Med**, v.16, n.3, May, p.186-93, 2010.

Lima, P., B. Sidders, L. Morici, R. Reader, R. Senaratne, N. Casali e L. W. Riley. Enhanced mortality despite control of lung infection in mice aerogenically infected with a *Mycobacterium tuberculosis* *mce1* operon mutant. **Microbes Infect**, v.9, n.11, Sep, p.1285-90, 2007.

Lin, P. L., J. Dietrich, E. Tan, R. M. Abalos, J. Burgos, C. Bigbee, M. Bigbee, L. Milk, H. P. Gideon, M. Rodgers, C. Cochran, K. M. Guinn, D. R. Sherman, E. Klein, C. Janssen, J. L. Flynn e P. Andersen. The multistage vaccine H56 boosts the effects of BCG to protect cynomolgus macaques against active tuberculosis and reactivation of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Clin Invest**, v.122, n.1, Jan 3, p.303-14, 2012.

Locht, C., J. M. Hougardy, C. Rouanet, S. Place e F. Mascart. Heparin-binding hemagglutinin, from an extrapulmonary dissemination factor to a powerful diagnostic and protective antigen against tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v.86, n.3-4, May-Jul, p.303-9, 2006.

Lockhart, E., A. M. Green e J. L. Flynn. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol**, v.177, n.7, Oct 1, p.4662-9, 2006.

Loeffler, A. M., Schecter, G. Francis J. Curry National Tuberculosis Center and California Department of Public Health: Tuberculosis drug information guide. 2009.

Lopez, B., D. Aguilar, H. Orozco, M. Burger, C. Espitia, V. Ritacco, L. Barrera, K. Kremer, R. Hernandez-Pando, K. Huygen e D. Van Soolingen. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. **Clin Exp Immunol**, v.133, n.1, Jul, p.30-7, 2003.

Mak, A., A. Thomas, M. Del Granado, R. Zaleskis, N. Mouzafarova e D. Menzies. Influence of multidrug resistance on tuberculosis treatment outcomes with standardized regimens. **Am J Respir Crit Care Med**, v.178, n.3, Aug 1, p.306-12, 2008.

- Malen, H., F. S. Berven, K. E. Fladmark e H. G. Wiker. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Proteomics**, v.7, n.10, May, p.1702-18, 2007.
- Malen, H., G. A. De Souza, S. Pathak, T. Softeland e H. G. Wiker. Comparison of membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra strains. **BMC Microbiol**, v.11p.18, 2011.
- Marjanovic, O., A. T. Iavarone e L. W. Riley. Sulfolipid accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* disrupted in the *mce2* operon. **J Microbiol**, v.49, n.3, Jun, p.441-7, 2011.
- Marjanovic, O., T. Miyata, A. Goodridge, L. V. Kendall e L. W. Riley. *Mce2* operon mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis* is attenuated in C57BL/6 mice. **Tuberculosis (Edinb)**, v.90, n.1, Jan, p.50-6, 2010.
- Mattow, J., U. E. Schaible, F. Schmidt, K. Hagens, F. Siejak, G. Brestrich, G. Haeselbarth, E. C. Muller, P. R. Jungblut e S. H. Kaufmann. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. **Electrophoresis**, v.24, n.19-20, Oct, p.3405-20, 2003.
- Mcadam, R. A., S. Quan, D. A. Smith, S. Bardarov, J. C. Betts, F. C. Cook, E. U. Hooker, A. P. Lewis, P. Woollard, M. J. Everett, P. T. Lukey, G. J. Bancroft, W. R. Jacobs Jr, Jr. e K. Duncan. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv transposon library reveals insertions in 351 ORFs and mutants with altered virulence. **Microbiology**, v.148, n.Pt 10, Oct, p.2975-86, 2002.
- Mcshane, H. e A. Hill. Prime-boost immunisation strategies for tuberculosis. **Microbes Infect**, v.7, n.5-6, May, p.962-7, 2005.
- Mcshane, H., A. A. Pathan, C. R. Sander, S. M. Keating, S. C. Gilbert, K. Huygen, H. A. Fletcher e A. V. Hill. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. **Nat Med**, v.10, n.11, Nov, p.1240-4, 2004.
- Means, T. K., B. W. Jones, A. B. Schromm, B. A. Shurtleff, J. A. Smith, J. Keane, D. T. Golenbock, S. N. Vogel e M. J. Fenton. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. **J Immunol**, v.166, n.6, Mar 15, p.4074-82, 2001.
- Medzhitov, R. e C. Janeway, Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. **Trends Microbiol**, v.8, n.10, Oct, p.452-6, 2000.
- Meintjes, G., S. D. Lawn, F. Scano, G. Maartens, M. A. French, W. Worodria, J. H. Elliott, D. Murdoch, R. J. Wilkinson, C. Seyler, L. John, M. S. Van Der Loeff, P. Reiss, L. Lynen, E. N. Janoff, C. Gilks e R. Colebunders. Tuberculosis-associated

immune reconstitution inflammatory syndrome: case definitions for use in resource-limited settings. **Lancet Infect Dis**, v.8, n.8, Aug, p.516-23, 2008.

Menzies, D., A. Benedetti, A. Paydar, S. Royce, P. Madhukar, W. Burman, A. Vernon e C. Lienhardt. Standardized treatment of active tuberculosis in patients with previous treatment and/or with mono-resistance to isoniazid: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Med**, v.6, n.9, Sep, p.e1000150, 2009.

Miller, R., W. Ewy, B. W. Corrigan, D. Ouellet, D. Hermann, K. G. Kowalski, P. Lockwood, J. R. Koup, S. Donevan, A. El-Kattan, C. S. Li, J. L. Werth, D. E. Feltner e R. L. Lalonde. How modeling and simulation have enhanced decision making in new drug development. **J Pharmacokinetic Pharmacodyn**, v.32, n.2, Apr, p.185-97, 2005.

Millington, K. A., J. A. Innes, S. Hackforth, T. S. Hinks, J. J. Deeks, D. P. Dosanjh, V. Guyot-Revol, R. Gunatheesan, P. Klenerman e A. Lalvani. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load. **J Immunol**, v.178, n.8, Apr 15, p.5217-26, 2007.

Mouton, J. W. e A. A. Vinks. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of antibacterials in vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics: the minimum inhibitory concentration versus stationary concentration. **Clin Pharmacokinetic**, v.44, n.2p.201-10, 2005.

Murray, P. J., A. Aldovini e R. A. Young. Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacille Calmette-Guerin strains that secrete cytokines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.2, Jan 23, p.934-9, 1996.

Mustafa, T., S. Phyu, R. Nilsen, R. Jonsson e G. Bjune. A mouse model for slowly progressive primary tuberculosis. **Scand J Immunol**, v.50, n.2, Aug, p.127-36, 1999.

Mustafa, T., H. G. Wiker, S. G. Mfinanga, O. Morkve e L. Sviland. Immunohistochemistry using a Mycobacterium tuberculosis complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis. **Mod Pathol**, v.19, n.12, Dec, p.1606-14, 2006.

Nagai, S., H. G. Wiker, M. Harboe e M. Kinomoto. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of Mycobacterium tuberculosis. **Infect Immun**, v.59, n.1, Jan, p.372-82, 1991.

Nogueira, L., F. C. Cardoso, A. M. Mattos, J. Bordignon, C. P. Figueiredo, P. Dahlstrom, C. C. Frota, C. N. Duarte Dos Santos, M. Chalhoub, B. S. Cavada, H. C. Teixeira, S. C. Oliveira, M. Barral-Netto e A. Bafica. Mycobacterium tuberculosis Rv1419 encodes a secreted 13 kDa lectin with immunological reactivity during human tuberculosis. **Eur J Immunol**, v.40, n.3, Mar, p.744-53, 2010.

- Notredame, C., D. G. Higgins e J. Heringa. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **J Mol Biol**, v.302, n.1, Sep 8, p.205-17, 2000.
- Ohol, Y. M., D. H. Goetz, K. Chan, M. U. Shiloh, C. S. Craik e J. S. Cox. Mycobacterium tuberculosis MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence. **Cell Host Microbe**, v.7, n.3, Mar 18, p.210-20, 2010.
- Olsen, A. W., A. Williams, L. M. Okkels, G. Hatch e P. Andersen. Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT-6 in the aerosol guinea pig model. **Infect Immun**, v.72, n.10, Oct, p.6148-50, 2004.
- Ottenhoff, T. H., D. Kumararatne e J. L. Casanova. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Immunol Today**, v.19, n.11, Nov, p.491-4, 1998.
- Pantaleo, G. e A. Harari. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. **Nat Rev Immunol**, v.6, n.5, May, p.417-23, 2006.
- Parish, T. e N. G. Stoker. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC mutant by gene replacement. **Microbiology**, v.146 ( Pt 8), Aug, p.1969-75, 2000.
- Pethe, K., D. L. Swenson, S. Alonso, J. Anderson, C. Wang e D. G. Russell. Isolation of Mycobacterium tuberculosis mutants defective in the arrest of phagosome maturation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.37, Sep 14, p.13642-7, 2004.
- Pizarro-Cerda, J. e P. Cossart. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v.124, n.4, Feb 24, p.715-27, 2006.
- Pluddemann, A., S. Mukhopadhyay e S. Gordon. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. **Immunol Rev**, v.240, n.1, Mar, p.11-24, 2011.
- Pompei, L., S. Jang, B. Zamylny, S. Ravikumar, A. McBride, S. P. Hickman e P. Salgame. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis is due to use of distinct TLRs. **J Immunol**, v.178, n.8, Apr 15, p.5192-9, 2007.
- Reed, M. B., P. Domenech, C. Manca, H. Su, A. K. Barczak, B. N. Kreiswirth, G. Kaplan e C. E. Barry, 3rd. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. **Nature**, v.431, n.7004, Sep 2, p.84-7, 2004.
- Reed, M. B., S. Gagneux, K. Deriemer, P. M. Small e C. E. Barry, 3rd. The W-Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis overproduces triglycerides and has

the DosR dormancy regulon constitutively upregulated. **J Bacteriol**, v.189, n.7, Apr, p.2583-9, 2007.

Reiling, N., C. Holscher, A. Fehrenbach, S. Kroger, C. J. Kirschning, S. Goyert e S. Ehlers. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**, v.169, n.7, Oct 1, p.3480-4, 2002.

Rhoades, E. R., A. A. Frank e I. M. Orme. Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent Mycobacterium tuberculosis. **Tuber Lung Dis**, v.78, n.1p.57-66, 1997.

Riley, L. W. Of mice, men, and elephants: Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and pathogenesis. **J Clin Invest**, v.116, n.6, Jun, p.1475-8, 2006.

Robbins, J. B., R. Schneerson e S. C. Szu. Hypothesis: how licensed vaccines confer protective immunity. **Adv Exp Med Biol**, v.397p.169-82, 1996.

Rodrigues, L. C., S. M. Pereira, S. S. Cunha, B. Genser, M. Y. Ichihara, S. C. De Brito, M. A. Hijjar, I. Dourado, A. A. Cruz, C. Sant'anna, A. L. Bierrenbach e M. L. Barreto. Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC cluster-randomised trial. **Lancet**, v.366, n.9493, Oct 8, p.1290-5, 2005.

Rosario, M. C., P. Jacqmin, P. Dorr, E. Van Der Ryst e C. Hitchcock. A pharmacokinetic-pharmacodynamic disease model to predict in vivo antiviral activity of maraviroc. **Clin Pharmacol Ther**, v.78, n.5, Nov, p.508-19, 2005.

Rosenkrands, I., A. King, K. Weldingh, M. Moniatte, E. Moertz e P. Andersen. Towards the proteome of Mycobacterium tuberculosis. **Electrophoresis**, v.21, n.17, Nov, p.3740-56, 2000.

Saint-Ruf, C. e I. Matic. Environmental tuning of mutation rates. **Environ Microbiol**, v.8, n.2, Feb, p.193-9, 2006.

Sargentini, V., S. Mariotti, S. Carrara, M. C. Gagliardi, R. Teloni, D. Goletti e R. Nisini. Cytometric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis. **BMC Infect Dis**, v.9p.99, 2009.

Sassetti, C. M., D. H. Boyd e E. J. Rubin. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. **Mol Microbiol**, v.48, n.1, Apr, p.77-84, 2003.

Sassetti, C. M. e E. J. Rubin. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.22, Oct 28, p.12989-94, 2003.

Saunders, B. M. e W. J. Britton. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. **Immunol Cell Biol**, v.85, n.2, Feb-Mar, p.103-11, 2007.

- Scanga, C. A., V. P. Mohan, H. Joseph, K. Yu, J. Chan e J. L. Flynn. Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model. **Infect Immun**, v.67, n.9, Sep, p.4531-8, 1999.
- Scanga, C. A., V. P. Mohan, K. Tanaka, D. Alland, J. L. Flynn e J. Chan. The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Infect Immun**, v.69, n.12, Dec, p.7711-7, 2001.
- Schentag, J. J., A. K. Meagher e A. Forrest. Fluoroquinolone AUC break points and the link to bacterial killing rates. Part 2: human trials. **Ann Pharmacother**, v.37, n.10, Oct, p.1478-88, 2003.
- Serbina, N. V., C. C. Liu, C. A. Scanga e J. L. Flynn. CD8+ CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. **J Immunol**, v.165, n.1, Jul 1, p.353-63, 2000.
- Sheiner, L. B. e J. L. Steimer. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug development. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.40p.67-95, 2000.
- Shimono, N., L. Morici, N. Casali, S. Cantrell, B. Sidders, S. Ehrt e L. W. Riley. Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the *mce1* operon. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.26, Dec 23, p.15918-23, 2003.
- Simpson, J. A., D. Hughes, C. Manyando, K. Bojang, L. Aarons, P. Winstanley, G. Edwards, W. A. Watkins e S. Ward. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of the antimalarial chemotherapy chlorproguanil/dapsone. **Br J Clin Pharmacol**, v.61, n.3, Mar, p.289-300, 2006.
- Skeiky, Y. A., M. R. Alderson, P. J. Owendale, J. A. Guderian, L. Brandt, D. C. Dillon, A. Campos-Neto, Y. Lobet, W. Dalemans, I. M. Orme e S. G. Reed. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. **J Immunol**, v.172, n.12, Jun 15, p.7618-28, 2004.
- Solovic, I., M. Sester, J. J. Gomez-Reino, H. L. Rieder, S. Ehlers, H. J. Milburn, B. Kampmann, B. Hellmich, R. Groves, S. Schreiber, R. S. Wallis, G. Sotgiu, E. H. Scholvinck, D. Goletti, J. P. Zellweger, R. Diel, L. Carmona, F. Bartalesi, P. Ravn, A. Bossink, R. Duarte, C. Erkens, J. Clark, G. B. Migliori e C. Lange. The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. **Eur Respir J**, v.36, n.5, Nov, p.1185-206, 2010.
- Stanley, S. A., J. E. Johndrow, P. Manzanillo e J. S. Cox. The Type I IFN response to infection with *Mycobacterium tuberculosis* requires ESX-1-mediated secretion and contributes to pathogenesis. **J Immunol**, v.178, n.5, Mar 1, p.3143-52, 2007.

Sullivan, B. M., O. Jobe, V. Lazarevic, K. Vasquez, R. Bronson, L. H. Glimcher e I. Kramnik. Increased susceptibility of mice lacking T-bet to infection with *Mycobacterium tuberculosis* correlates with increased IL-10 and decreased IFN-gamma production. **J Immunol**, v.175, n.7, Oct 1, p.4593-602, 2005.

Svensson, U. S., H. Alin, M. O. Karlsson, Y. Bergqvist e M. Ashton. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of artemisinin and mefloquine enantiomers in patients with falciparum malaria. **Eur J Clin Pharmacol**, v.58, n.5, Aug, p.339-51, 2002.

Teitelbaum, R., A. Glatman-Freedman, B. Chen, J. B. Robbins, E. Unanue, A. Casadevall e B. R. Bloom. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.26, Dec 22, p.15688-93, 1998.

Temmerman, S., K. Pethe, M. Parra, S. Alonso, C. Rouanet, T. Pickett, A. Drowart, A. S. Debrie, G. Delogu, F. D. Menozzi, C. Sergheraert, M. J. Brennan, F. Mascart e C. Locht. Methylation-dependent T cell immunity to *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin. **Nat Med**, v.10, n.9, Sep, p.935-41, 2004.

Thaiss, W. M., C. C. Thaiss e C. A. Thaiss. Recent developments in the epidemiology and management of tuberculosis - new solutions to old problems? **Infect Drug Resist**, v.5p.1-8, 2012.

Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M. T. Ochoa, M. Engele, P. A. Sieling, P. F. Barnes, M. Rollinghoff, P. L. Bolskei, M. Wagner, S. Akira, M. V. Norgard, J. T. Belisle, P. J. Godowski, B. R. Bloom e R. L. Modlin. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. **Science**, v.291, n.5508, Feb 23, p.1544-7, 2001.

Tielker, D., S. Hacker, R. Loris, M. Strathmann, J. Wingender, S. Wilhelm, F. Rosenau e K. E. Jaeger. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. **Microbiology**, v.151, n.Pt 5, May, p.1313-23, 2005.

Tollefsen, S., T. Tjelle, J. Schneider, M. Harboe, H. Wiker, G. Hewinson, K. Huygen e I. Mathiesen. Improved cellular and humoral immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation. **Vaccine**, v.20, n.27-28, Sep 10, p.3370-8, 2002.

Torrado, E., R. T. Robinson e A. M. Cooper. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. **Trends Immunol**, v.32, n.2, Feb, p.66-72, 2011.

Tuteja, R. Type I signal peptidase: an overview. **Arch Biochem Biophys**, v.441, n.2, Sep 15, p.107-11, 2005.

Uchida, Y., N. Casali, A. White, L. Morici, L. V. Kendall e L. W. Riley. Accelerated immunopathological response of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* disrupted in the *mce1* operon negative transcriptional regulator. **Cell Microbiol**, v.9, n.5, May, p.1275-83, 2007.

Ulrichs, T., M. Lefmann, M. Reich, L. Morawietz, A. Roth, V. Brinkmann, G. A. Kosmiadi, P. Seiler, P. Aichele, H. Hahn, V. Krenn, U. B. Gobel e S. H. Kaufmann. Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue. **J Pathol**, v.205, n.5, Apr, p.633-40, 2005.

Van Dissel, J. T., D. Soonawala, S. A. Joosten, C. Prins, S. M. Arend, P. Bang, P. N. Tingskov, K. Lingnau, J. Nouta, S. T. Hoff, I. Rosenkrands, I. Kromann, T. H. Ottenhoff, T. M. Doherty e P. Andersen. Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31(R) promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in volunteers with previous BCG vaccination or tuberculosis infection. **Vaccine**, v.29, n.11, Mar 3, p.2100-9, 2011.

Van Soolingen, D., P. W. Hermans, P. E. De Haas, D. R. Soll e J. D. Van Embden. 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, n.11, Nov, p.2578-86, 1991.

Walburger, A., A. Koul, G. Ferrari, L. Nguyen, C. Prescianotto-Baschong, K. Huygen, B. Klebl, C. Thompson, G. Bacher e J. Pieters. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. **Science**, v.304, n.5678, Jun 18, p.1800-4, 2004.

Wang, Y., L. Zhang, W. L. Picking, W. D. Picking e R. N. De Guzman. Structural dissection of the extracellular moieties of the type III secretion apparatus. **Mol Biosyst**, v.4, n.12, Dec, p.1176-80, 2008.

White, S. H. e G. Von Heijne. How translocons select transmembrane helices. **Annu Rev Biophys**, v.37p.23-42, 2008.

Who. World Health Organization. Tuberculosis and HIV - A clinical manual 2nd edition. 2004.

\_\_\_\_\_. World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes WHO/CDS/TB/2008 2008.

\_\_\_\_\_. World Health Organization. Fact Sheet. Geneva., 2010.

Winau, F., S. Weber, S. Sad, J. De Diego, S. L. Hoops, B. Breiden, K. Sandhoff, V. Brinkmann, S. H. Kaufmann e U. E. Schaible. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity**, v.24, n.1, Jan, p.105-17, 2006.

Winston, A., G. Hales, J. Amin, E. Van Schaick, D. A. Cooper e S. Emery. The normalized inhibitory quotient of boosted protease inhibitors is predictive of viral load response in treatment-experienced HIV-1-infected individuals. **AIDS**, v.19, n.13, Sep 2, p.1393-9, 2005.

Wu, A. M., J. H. Wu, T. Singh, J. H. Liu, M. S. Tsai e N. Gilboa-Garber. Interactions of the fucose-specific *Pseudomonas aeruginosa* lectin, PA-IIL, with mammalian glycoconjugates bearing polyvalent Lewis(a) and ABH blood group glycotopes. **Biochimie**, v.88, n.10, Oct, p.1479-92, 2006.