LARISSA VILELA NASCIMENTO

Estudo comparativo de promotores de
micobactérias utilizando GFP como gene
repórter para o desenvolvimento de
vacinas de BCG recombinante

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo pelo Programa de Pós-graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção de
título de Mestre.

São Paulo
2015

LARISSA VILELA NASCIMENTO

Estudo comparativo de promotores de
micobactérias utilizando GFP como gene
repórter para o desenvolvimento de
vacinas de BCG recombinante

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo pelo Programa de Pós-graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção de
título de Mestre.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof.^a Dra. Luciana C. C. Leite

Versão original.

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Nascimento, Larissa Vilela.

Estudo comparativo de promotores de micobactérias utilizando GFP como gene reporter para o desenvolvimento de vacinas de BCG recombinante / Larissa Vilela Nascimento. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Luciana Cézar de Cerqueira Leite.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Vacinas Recombinante.

Versão do título para o inglês: Comparative study of mycobacterial promoters using GFP as a reporter gene for the development of recombinant BCG vaccines.

1. Micobactéria 2. Promotores de expressão 3. Proteína verde fluorescente (gfp) I. Leite, Profa. Dra. Luciana Cézar de Cerqueira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB066/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Larissa Vilela Nascimento.

Título da Dissertação: Estudo comparativo de promotores de micobactérias utilizando GFP como gene reporter para o desenvolvimento de vacinas de BCG recombinante.

Orientador(a): Profa. Dra. Luciana César de Cerqueira Leite.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)** ☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo comparativo de promotores de micobactérias utilizando GFP como gene repórter para o desenvolvimento de vacinas de BCG recombinante", **protocolo nº 1264/14**, sob a responsabilidade de Luciana Cezar de Cerqueira Leite e Larissa Vilela Nascimento – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os *Princípios Éticos na Experimentação Animal* adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 18/6/2014.

This is to certify that the proposal "Comparative study of mycobacterial promoters using GFP as a reporter for the development of vaccines of recombinant BCG gene", **protocol nº 1264/14**, under the responsibility of Luciana Cezar de Cerqueira Leite and Larissa Vilela Nascimento – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 6/18/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
06/2014 - 12/2014 Laboratório de Biotecnologia Molecular IV	108 Camundongos Balb/c 20g (F) - Procedentes da Faculdade de Medicina/USP

São Paulo, 20 de junho de 2014

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz Antônio e Walkiria, e meus irmãos, Eduardo, Luiz e Patrick, pelo incentivo direto ou indireto para alcançar mais esse objetivo;

Aos meus avôs Eurípedes (*in memoriam*) e Maria de Lourdes, pelo carinho recebido todos esses anos;

A minha avó Maria Nicolau, pelas infinitas orações diárias;

A Dra. Luciana Leite, por me receber em seu laboratório e pela orientação;

Ao Dr. Ivan Nascimento, por ensinar o jeito certo e o outro jeito de realizar os experimentos;

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia Molecular IV, Alex, Carina, Cibelly, Dunia, Henrique, Juliana, Mayra, Michelle, Rafaela, Thiago, que contribuíram com meu crescimento pessoal, seja tirando dúvidas acadêmicas, seja indo pro bar “tomar umas”;

As amigas Aline e Tainá, por terem dividido não só o mesmo teto que eu, mas também suas histórias de vida;

A amiga Carol Gonçalves, pelas loucas visitas a São Paulo que renderam boas histórias;

A amiga Thais Podestá, por ter seguido seu sonho de ser atriz e assim, tirar-me um pouco desse mundo “nerd” de pós-graduação;

Aos amigos da minha cidade natal, Passos/MG, e aos amigos que fiz durante a faculdade, em Alfenas/MG, que estão sempre prontos pra curtir ou, como falamos em Passos, prontos pra “barbarizar”.

“Viver é a coisa mais rara do mundo. A maioria das pessoas apenas existe.”
Oscar Wilde

“Se queres vencer o mundo inteiro, vence-te a ti mesmo.”
Fiódor Dostoiévski

*“De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que ele estava sempre começando,
A certeza de que era preciso continuar
E a certeza de que seria interrompido antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo.
Fazer da queda um passo de dança,
Do medo uma escada,
Do sono uma ponte,
Da procura um encontro.”*
O Encontro Marcado, Fernando Sabino

RESUMO

NASCIMENTO, L. V. **Estudo comparativo de promotores de micobactérias utilizando GFP como gene repórter para o desenvolvimento de vacinas de BCG recombinante.** 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O *Mycobacterium bovis* BCG é um sistema de apresentação de antígenos que tem merecido bastante atenção, uma vez que é uma das vacinas mais utilizadas no mundo. Avanços na manipulação genética de micobactérias têm permitido o seu uso como carreador de antígenos heterólogos, porém, o aprimoramento dos sistemas de expressão dessas cepas recombinantes ainda se faz necessário, sendo o promotor um importante elemento desse sistema, uma vez que regula o nível de produção do antígeno, fator determinante para a indução de uma resposta imunológica adequada. Assim, o presente estudo avaliou a atividade de diferentes promotores de micobactérias, como o $P_{\alpha Ag}$, P_{AN} , P_{BlaF^*} , P_{hsp60} e um promotor ainda não caracterizado do micobacteriófago L5, denominado P_{L5} , usando como repórter da atividade de expressão gênica o gene *gfp*, todos clonados no mesmo vetor extracromossomal, pLA71. Foi possível avaliar as cepas de *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG fluorescentes para quase todas as construções e alguns plasmídeos pLA71-p Σ mostraram características diferentes dependentes da micobactéria transformada. Não foi possível obter nenhum transformante com o plasmídeo pLA71- P_{L5} -*gfp*. Colocados numa escala gradual de força de expressão, em geral os diferentes promotores se apresentaram como fraco (pLA71- P_{AN} -*gfp*), médio (pLA71- P_{BlaF^*} -*gfp*) e forte (pLA71- P_{hsp60} -*gfp*). As cepas de BCG recombinantes foram usadas para transfecção de macrófagos RAW 264.7, e a atividade dos promotores não foi afetada após a internalização. Outra abordagem foi a investigação da localização do BCG após a inoculação em camundongos. Foi possível confirmar a presença de colônias de BCG (recombinantes ou não) nos pulmões dos camundongos após 1 e 3 dias de inoculação, por plaqueamento direto em meio sólido e por microscopia confocal.

Palavras-chave: Micobactérias. Promotores de expressão. Proteína verde fluorescente (*gfp*).

ABSTRACT

Nascimento, L. V. **Comparative study of mycobacterial promoters using GFP as a reporter gene for the development of recombinant BCG vaccines.** 2015. 69 p. Masters thesis (Biotechnology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The *Mycobacterium bovis* BCG is an antigen presentation system which has received considerable attention since it is one of the most widely used vaccines in the world. Advances in genetic manipulation of mycobacteria have allowed their use as a carrier for heterologous antigens, however, the improvement of expression of recombinant strains of these systems is still necessary, the promoter being an important element of this system, since it regulates the expression level of the antigen, a determining factor for the induction of an adequate immune response. The present study evaluated the activity of different promoters of mycobacteria, such as $P_{\alpha Ag}$, P_{AN} , P_{BlaF^*} and P_{hsp60} , and the not yet characterized promoter of the micobacteriophage L5, called P_{L5} , using as a reporter for gene expression the *gfp* gene, all cloned in the same extrachromosomal vector, pLA71. It was possible to evaluate promoters in the *M. smegmatis* and *M. bovis* BCG strains, fluorescent for almost all constructions and some pLA71-p Σ plasmids showed different characteristics dependent on the transformed mycobacterium. We could not get any transformants with the pLA71- P_{L5} -*gfp* plasmid. In comparison, the different promoters showed expression levels as weak (pLA71- P_{AN} -*gfp*), medium (pLA71- P_{BlaF^*} -*gfp*) and strong (pLA71- P_{hsp60} -*gfp*). The recombinant BCG strains were used for transfection of RAW 264.7 macrophages and the activity of the promoters was not affected after internalization. Another approach was to investigate the location of BCG after inoculation in mice. The determination of the presence of BCG in the lungs by flow cytometry was inconclusive, but it was possible to confirm the presence of BCG colonies (recombinant or not) in the lungs of mice 1 and 3 days after inoculation by direct plating on solid medium and by confocal microscopy.

Keywords: Mycobacteria. Promoters of expression. Green fluorescent protein (*gfp*).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática das etapas de construção dos cassetes de expressão.....	28
FIGURA 2 - Representação esquemática do vetor pLA71 utilizado e os cassetes de expressão, formados pelos respectivos promotores e o gene repórter <i>gfp</i>	30
FIGURA 3 - Gel de agarose contendo o produto de amplificação por PCR do gene da proteína fluorescente verde (<i>gfp</i>).....	37
FIGURA 4 - Gel de agarose contendo o produto de amplificação por PCR dos diferentes promotores.....	38
FIGURA 5 - Gel de agarose contendo o produto da fusão por <i>Double-joint</i> PCR dos diferentes promotores com o <i>gfp</i>	38
FIGURA 6 - Análise de restrição do plasmídeo pLA71-P _{AN} - <i>gfp</i> para confirmação da clonagem do cassete de expressão.....	40
FIGURA 7 - Análise da expressão de GFP em <i>E. coli</i> DH5 α transformadas com as diferentes construções de pLA71-p Σ	41
FIGURA 8 - Expressão de GFP em <i>M. smegmatis</i> transformados com os diferentes vetores de expressão pLA71-p Σ	42
FIGURA 9 - Expressão de GFP em <i>M. bovis</i> BCG transformados com os diferentes vetores de expressão pLA71-p Σ	43
FIGURA 10 - Expressão de GFP em <i>M. smegmatis</i> (A) ou BCG (B) transformadas com os diferentes vetores de expressão pLA71-p Σ	44
FIGURA 11 - Análise estatística dos diferentes clones de <i>M. smegmatis</i> expressando GFP após transformação com os plasmídeos pLA71-p Σ	45
FIGURA 12 - Análise estatística dos diferentes clones de <i>M. bovis</i> BCG expressando GFP após transformação com os plasmídeos pLA71-p Σ	45
FIGURA 13 - Análise de fluorescência em cultivo de macrófagos, linhagem RAW 264.7, após infecção com BCG e rBCG pLA71-P _{hsp60} - <i>gfp</i>	46
FIGURA 14 - Macrófagos RAW 264.7 infectados com BCG ou BCG recombinantes.....	47
FIGURA 15 - Macrófagos (RAW 264.7) infectados com BCG ou BCG recombinantes.....	48
FIGURA 16 - Análise da estabilidade dos BCG recombinantes após inoculação em camundongos.....	50
FIGURA 17 - Análise comparativa entre a fluorescência emitida pela expressão	

de GFP em BCG recombinante em cultivo e após internalizado por macrófagos.....	51
FIGURA 18 - Análise comparativa entre a intensidade de fluorescência emitida por GFP expressa em dois BCG recombinantes diferentes.....	51
FIGURA 19 - Cinética de recuperação de BCG e BCG recombinante no linfonodo e pulmão após imunização subcutânea.....	52
FIGURA 20 - Definição das subpopulações celulares de Macrófago e Neutrófilo no homogenato de pulmão através de seus respectivos marcadores CD11b e Ly6G.....	53
FIGURA 21 - Análise de fluorescência emitida por GFP pela subpopulações de macrófagos e neutrófilos em homogenato de pulmão de camundongos imunizados (s.c. ou i.d.) com rBCG pJH223- P_{L5} - <i>gfp</i> após 1 dia.....	54
FIGURA 22 - Microscopia confocal de homogenatos de pulmão e de linfonodo inguinal de camundongos inoculados com BCG recombinante expressando GFP.....	56
FIGURA 23 - Microscopia confocal de homogenatos de pulmões de camundongos inoculados com BCG recombinante expressando GFP.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Iniciadores usados para amplificação das sequencias correspondentes aos diferentes promotores e ao gene <i>gfp</i>	26
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES

kV, kilovolts

μ F, micro Faradays

Ω , ohms

BCG, Bacille de Calmette e Guérin

BSA, albumina sérica bovina

DNA, do inglês “deoxyribonucleic acid”

dNTP, deoxirubonucleotídeo trifosfato

FITC, do inglês “fluorescent isothiocyanate”

FSC, do inglês “forward scatter channel”

GFP, do inglês “green fluorescent protein”

IP, iodeto de propídeo

LB, meio Luria-Bertani

MB7H9, meio de cultura Middlebrook 7H9

MB7H10, meio de cultura Middlebrook 7H10

M.O.I., *multiplicidade de infecção*

OADC, ácido oleico-albumina-dextrose-catalase

oriE, origem de replicação em *E. coli*

oriM, origem de replicação em micobactéria

pb, pares de bases

PBS, solução salina tamponada

PCR, do inglês “polymerase chain reaction”

rBCG, BCG recombinante

RBS, do inglês “ribosome binding site”

rpm, rotação por minuto

RPMI, do inglês “Roswell Park Memorial Institute”

SSC, do inglês “side scatter channel”

TB, Tuberculose

UFC, unidade formadora de colônia

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Mycobacterium	15
1.2	<i>M. bovis</i> BCG	16
1.3	BCG recombinante.....	17
1.4	Sistemas de expressão em Mycobacterium	18
1.4.1	Vetores de expressão micobacterianos	18
1.4.2	Promotores micobacterianos.....	21
1.4.3	Gene repórter	22
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	Objetivo Geral.....	24
2.2	Objetivos Específicos	24
3	METODOLOGIA.....	25
3.1	Bactérias e meios de cultivos	25
3.2	Construção dos cassetes de expressão	25
3.3	Subclonagem em pGEM-T Easy	28
3.4	Clonagem no vetor pLA71	29
3.5	Micobactérias eletrocompetente.....	31
3.6	Transformações de <i>M. smegmatis</i> e <i>M. bovis</i> BCG	32
3.7	Animais	33
3.8	Ensaio in vitro com BCG recombinantes.....	33
3.8.1	Infecção de macrófagos	33
3.9	Ensaio in vivo com BCG recombinantes	34
3.9.1	Estabilidade.....	34
3.9.2	Localização	34
3.10	Análise de fluorescência	36
3.10.1	Citometria de Fluxo	36
3.10.2	Microscopia	36
4	RESULTADOS.....	37
4.1	Construção dos cassetes de expressão	37
4.2	Clonagem no vetor pLA71	39
4.3	Transformações de <i>M. smegmatis</i> e <i>M. bovis</i> BCG.....	41
4.4	Ensaio <i>in vitro</i> com BCG recombinantes.....	46
4.4.1	Infecção de macrófagos	46
4.5	Ensaio <i>in vivo</i> com BCG recombinantes	49
4.5.1	Estabilidade.....	49
4.5.2	Localização	50

5	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Mycobacterium*

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae*, que possui um único gênero, denominado *Mycobacterium* (*fungus bacterium*), nome proposto por Lehmann e Neumann em 1896, em referencia a película formada pelo *Mycobacterium tuberculosis* na superfície de meios líquidos que era similar a produzida por alguns fungos. São bacilos retos ou levemente curvados, podendo se apresentar na forma cocobacilar ou filamentosa, com 1-10 µm de comprimento por 0,2-0,6 µm de largura, variando de espécie para espécie. De maneira geral, os bacilos são imóveis, não esporulados, aeróbios ou microaerófilos (EISENSTADT; HALL, 1995).

Sua principal característica é a capacidade de resistir à descoloração quando tratadas com álcool-ácido. Pelo método de Ziehl-Neelsen, a álcool-ácido resistência consiste no fato de que as micobactérias, quando tratadas pela fucsina fenicada, resistem à descoloração subsequente por uma solução de álcool-ácido, permanecendo coradas em vermelho. A álcool-ácido resistência é uma propriedade do organismo intacto, como também de sua estrutura química, particularmente de seu conteúdo em ácido micólico. Algumas micobactérias, tais como o *M. tuberculosis*, contêm mais ácido micólico do que as espécies saprofíticas e isso pode justificar o fato de eles serem mais fortemente ácido resistentes (NOLTE; METCHOCK, 1995).

Mais de 120 espécies já foram reconhecidas, que podem ser categorizadas em patógenos estritos como *M. tuberculosis*, patógenos oportunistas como *M. avium* e não patógenos como *M. smegmatis*. Outra classificação leva como base a taxa de crescimento, dividindo as espécies em dois grandes grupos: 1) micobactérias de crescimento lento, que possuem um tempo de geração em torno de 13 h e, portanto, necessitam de 3 semanas a 3 meses de cultura para fornecer colônias visíveis; 2) micobactérias de crescimento rápido, que possuem um tempo de geração em torno de 2-5 h e necessitam de 3-5 dias para fornecer colônias visíveis. Entre as espécies de

crescimento lento estão incluídas alguns dos maiores patógenos para animais e humanos, e entre as de crescimento rápido as não patogênicas (NOLTE; METCHOCK, 1995).

Quando o objetivo é testar modelos ou sistemas genéticos em micobactérias, *M. smegmatis* é a espécie mais utilizada, por não ser patogênica, possuir similaridade genética ao *M. bovis* BCG e pertencer ao grupo de micobactérias de crescimento rápido, apresentando colônias visíveis após 3-4 dias de cultura (sete vezes mais rápido que BCG), favorecendo a identificação de cepas transformantes (SNAPPER et al., 1990). Alguns estudos têm proposto a utilização de *M. smegmatis* também como um veículo vacinal, por exemplo, contra a tuberculose (EREMEEV et al., 1996), HIV (CAYABYAB et al., 2006) ou infecção por *Helicobacter pylori* (LÜ et al., 2009).

1.2 *M. bovis* BCG

Bacille Calmette-Guérin (BCG) é uma cepa de *Mycobacterium bovis* que foi atenuada entre 1906 e 1920 após mais de 200 passagens em meio de batata glicerizada contendo bile bovina. Estudos subsequentes demonstraram que, mesmo depois da sua completa atenuação, o BCG ainda apresentava infectividade quando inoculado em diversos modelos animais experimentais. Em 1928, após sucessivos estudos experimentais, o BCG foi recomendado pela Liga das Nações como vacina oficial contra a tuberculose humana (TB) (CALMETTE, 1931). Desde então é a única vacina corrente contra TB, sendo a mais usada no mundo com mais de três bilhões de pessoas inoculadas desde o seu início, com baixa incidência de complicações sérias. No entanto, os efeitos protetores induzidos pelo BCG são variáveis de acordo com a idade. A vacina não possui bom funcionamento na prevenção da tuberculose pulmonar em adultos (COLDITZ et al., 1994).

BCG é uma vacina segura, estável a temperatura ambiente, possui baixo custo de produção, pode ser administrada após o nascimento em dose única e poderia também ser administrada por via oral (BLOOM; JACOBS, 1989) e é reconhecidamente um potente adjuvante, sendo capaz de estabelecer uma

infecção persistente e induzir uma resposta imune tanto humoral quanto celular. Essas vantagens fazem do BCG um vetor vivo altamente atrativo para o desenvolvimento de vacinas recombinantes.

1.3 BCG recombinante

O interesse no BCG aumentou consideravelmente na década de noventa com o desenvolvimento de diferentes sistemas genéticos para a expressão de antígenos heterólogos em micobactérias. O objetivo principal em sua manipulação está na produção de uma vacina multivalente que se beneficie da capacidade do BCG de se replicar dentro de células apresentadoras de antígeno, tais como macrófagos e células dendríticas, além da sua capacidade adjuvante (BASTOS et al., 2009).

O bacilo tem sido manipulado para produzir subcepas de BCG recombinantes (rBCG), que expressam genes de outras micobactérias, de outros patógenos, assim como moléculas imunorreguladoras (BRITTON et al., 2003). Funcionando como um 'sistema de entrega' de produtos gênicos heterólogos, este seria capaz de induzir respostas imunológicas de longa duração, e muitas vezes protetoras (GICQUEL et al., 1995). Desde que esta proposta foi lançada, vários antígenos já foram clonados com sucesso em BCG, tais como antígenos virais, como em pesquisas contra o HIV (ALDOVINI, YOUNG, 1991; LAGRANDERIE et al., 1998; VENKATASWAMY et al., 2014); bacterianos, como por exemplo contra a *Bordetella pertussis* (NASCIMENTO et al., 2000), e parasitários, como contra a *Leishmania major* (ABDELHAK et al. (1995) e o *Shistosoma mansoni* (VARALDO et al., 2004), ou até mesmo em vacinas melhoradas de BCG contra a tuberculose (DA COSTA et al., 2014; HOFT et al., 2008; VOGELZANG et al.; 2014).

O desenvolvimento de vacinas baseadas em BCG recombinante passa necessariamente pela construção de sistemas ou vetores de expressão em micobactérias, que incluem estratégias de transformação bacterianas, manipulação desses vetores *in vitro*, promotores com diferentes forças de expressão, marcadores de seleção, preferencialmente sem gene de resistência

a antibiótico, capacidade para inserção ou sítios de restrição para sequências específicas, entre outras características, são fundamentais num vetor de expressão (BASTOS et al., 2009).

1.4 Sistemas de expressão em *Mycobacterium*

1.4.1 Vetores de expressão micobacterianos

Vetores são veículos de clonagem utilizados na engenharia genética para a inserção de DNA exógeno dentro de um hospedeiro. Os vetores de expressão em micobactérias são chamados de “shuttle vectors” (plasmídeos-ponte), pois permitem a manipulação em *E. coli* e em micobactéria pelo fato de possuírem origem de replicação para ambas as espécies.

Um dos primeiros vetores, criado por Jacobs et al. (1987), foi desenvolvido pela combinação de sequências genéticas do cosmídeo pHC79 de *E. coli*, que possuía o gene de resistência ao antibiótico ampicilina, à um micobacteriófago TM4 de *M. avium*. Esta construção foi denominada de fasmídeo phAE1 e se comportava como um fasmídeo-ponte, pois se apresenta como plasmídeo em *E. coli* e como fago em micobactéria.

Seguindo essa linha, Snapper et al. (1988) substituíram o micobacteriófago TM4 pelo micobacteriófago temperado L1, no qual inseriram o mesmo cosmídeo pHC79 numa região não essencial de L1, obtendo o fasmídeo phAE15. Em seguida, foi introduzido um fragmento de 1,6 Kb contendo o gene *aph* de resistência a canamicina, oriundo do transposon Tn903 no fasmídeo phAE15, dando origem ao fasmídeo phAE19, que possui resistência aos antibióticos ampicilina e canamicina simultaneamente. Nesse mesmo estudo, também foi construído o primeiro sistema de expressão baseado apenas em plasmídeo, denominado pYUB12, misturando fragmentos do plasmídeo pAL5000 de *M. fortuitum* e do plasmídeo pIJ666 de *E. coli* e que utilizava o gene de canamicina como marcador de pressão seletiva.

Esta primeira geração de fasmídeo-ponte ou plasmídeo-ponte demonstrou a possibilidade de se transformar geneticamente espécies micobacterianas. No entanto, algumas desvantagens tornavam estes vetores pouco práticos, como seu tamanho, falta de sítios de restrição adequados para clonagem e sua instabilidade em BCG na ausência de antibióticos.

Com Stover et al. (1991) surgiram uma segunda geração de plasmídeos-ponte denominados de pMV261 (extracromossal) e pMV361 (integrativo), sendo amplamente utilizados até hoje. Ambos possuem elementos comuns, como o cassete de expressão, contendo o promotor *hsp60*, sítio múltiplo de clonagem, o gene *aph* derivado do Tn903 que confere resistência à canamicina, origem de replicação de *E. coli* derivada do plasmídeo pUC19 e origem de replicação de micobactéria derivada do plasmídeo pAL5000. O plasmídeo pMV361 difere do pMV261 pela inclusão dos genes *attP* (sítio de integração) e *int* (gene da integrase) de micobacteriófago L5, que permite sua integração ao DNA micobacteriano.

Este recurso genético utilizado na transformação micobacteriana apresenta vantagens e desvantagens. Os vetores integrativos tendem a ser mais estáveis, uma vez que estão integrados no genoma da bactéria, porém estão em cópia única, refletindo assim no nível de expressão. Já os vetores extracromossomais, por manterem mais cópias, geralmente exibem maiores níveis de expressão, todavia são menos estáveis, precisando de pressão seletiva constante no meio para evitar a perda do plasmídeo (STOVER et al., 1991). No entanto, uma maneira de atenuar essa desvantagem dos vetores integrativos, seria utilizar o elemento de inserção IS900, que promove uma integração aleatória ao genoma bacteriano, apresentando assim o potencial de estar presente em varias copias (DELLAGOSTIN et al., 1993).

São variados os elementos que podem estar presentes em um vetor micobacteriano, mas essencialmente se observa um gene marcador de resistência a antibiótico, origem de replicação em *E. coli* para expansão do plasmídeo, origem de replicação em micobactéria, promotor ativo em micobactéria e sítios de enzimas de restrição para inserção de sequências de interesse e sítio para integração ao genoma para os vetores integrativos (BASTOS et al., 2009). A marca de seleção de resistência a antibiótico pode ser substituída pelo uso de BCG auxotróficos complementados, no caso da

construção ser pensada já como vacina para uso em humanos, onde se deve evitar a disseminação de genes de resistência a antibióticos (BORSUK et al., 2007; NASCIMENTO, et al., 2009).

Outros elementos que podem estar presentes são: a presença de uma sequência sinal após o códon de iniciação, direcionando a exportação da proteína de interesse; uma sequência Shine-Dalgarno, anterior ao códon de iniciação, sendo um sítio RBS no mRNA transcrito (do inglês, “*ribosome binding site*”) auxiliando na tradução de proteínas. A utilização de genes sintéticos com códon otimizado também facilita o processo de tradução (DENNEHY; WILLIAMSON, 2005).

Timm et al. (1994b) desenvolveram uma série de plasmídeos-ponte, denominados pJEM, que permitia a fusão de um operon ou de um gene com o gene repórter lacZ, de *E. coli*. Através dessa fusão, era possível avaliar vários promotores micobacterianos, tanto em *M. smegmatis* quanto em BCG, através da atividade da enzima β -galactosidase. Dando continuidade aos estudos, Lim et al. (1995) construíram o vetor pJEM11, que possuía o gene *phoA* de *E. coli* truncado para possível identificação de sequências de exportação de proteínas de *M. tuberculosis*. Com a inserção de fragmentos ou da sequência completa do promotor da β -lactamase, foram construídos os plasmídeos-ponte pLA71, pLA72 e pLA73.

Embora muitos avanços tenham sido obtidos desde então no desenvolvimento de sistemas de expressão em micobactérias, esse campo continua em aberto e com interesses renovados, devido ao real potencial do uso de BCG recombinante como veículo vivo para apresentação de moléculas heterólogas, seja com fins vacinais ou imunoterapêuticos (MATSUO; YASUTOMI, 2011).

No presente estudo, utilizamos o vetor pLA71, que contem origens de replicação em *E. coli* e em micobactérias, gene de resistência à canamicina, promotor da proteína β -lactamase de *M. fortuitum* (P_{BlaF^+}) e sítios de multiclonagem, onde são inseridas as sequências de interesse. Este vetor se mostrou bastante eficiente e instável em trabalhos do nosso laboratório (NASCIMENTO et al. 2000, 2009), quando usado para clonagem e expressão da subunidade 1 da toxina de *Bordetella pertussis* em BCG, inclusive após a substituição do marcador de seleção para canamicina por um sistema de

complementação de auxotrofia, o que permitiu que esta vacina esteja em fase de escalonamento para uso em ensaio clínico.

1.4.2 Promotores micobacterianos

A escolha do promotor para direcionar a expressão do gene de interesse é essencial, pois será um dos fatores mais determinantes na expressão dos genes. Promotores são regiões de DNA localizadas entre a posição -50 e +10 do ponto de partida da transcrição. Em micobactérias, geralmente são ricos em G + C e assemelham-se muito aos promotores de *Streptomyces* (ambos os gêneros pertencem à Ordem *Actinomycetales*).

Os primeiros promotores homólogos de micobactérias a serem utilizados amplamente foram os promotores de genes que codificam proteínas de choque térmico, ou *heat-shock*. O promotor *hsp60*, isolado do próprio BCG, foi inserido nos vetores pMV261 e pMV361, juntamente com o gene *lacZ*, num novo uso do BCG como vacina recombinante (STOVER et al., 1991). Já o promotor *hsp70*, também isolado de BCG, foi inserido no vetor pYUB12 para expressão de três diferentes genes de HIV tipo 1 (Env, Gag e Pol) em BCG (ALDOVINI; YOUNG, 1991). Os promotores de *heat-shock* aparentam induzir expressão de forma mais constitutiva, apesar de ser induzível em certas condições de estresse, como a súbita elevação de temperatura.

Mais adiante, outros promotores foram isolados e testados. Matsuo et al. (1990) desenvolveram um sistema de expressão utilizando o promotor do antígeno α (alfa) de *M. kansasii* para expressão de antígenos de HIV tipo 1 (*gag* p17) nos vetores pIS18 e pIS27, escolhidos a partir de uma biblioteca de plasmídeos-ponte. Murray et al. (1992) isolaram e caracterizaram o promotor P_{AN} de *M. paratuberculosis* que se encontra próximo a um elemento de inserção IS9000 e que foi utilizado para expressar o gene *gp63* de *Leishmania major* por Abdelhak et al. (1995).

Stover et al. (1993) estudaram o promotor da proteína 19 kDa isolado de *M. tuberculosis*, juntamente com seu peptídeo sinal, expressando o antígeno OspA de *Borrelia burgdorferi* inseridos nos vetores desenvolvidos pelo mesmo

anteriormente. Dellagostin et al. (1993) utilizaram o promotor da proteína 18 kDa isolado de *M. leprae* para construir vetores integrativos que expressaram 2 antígenos virais (um da febre aftosa e outro da SIV) em *M. smegmatis*. Timm et al. (1994a) isolaram e caracterizaram o promotor P_{BlaF} de *M. fortuitum* e seu mutante P_{BlaF^*} , que mostrou ser mais forte que o original na produção de fosfatase alcalina (*phoA*) e na atividade da β -galactosidase.

Devido as semelhanças genéticas, promotores do gênero *Streptomyces* também foram estudados em BCG recombinantes, como o promotor *groES/groEL1* de *Streptomyces albus* (WINTER et al., 1991), clonado no vetor pRR3, juntamente com o gene *nef* do vírus HIV tipo 1.

Uma abordagem interessante é clonar uma série de promotores diferentes num mesmo vetor de expressão, e relacionar sua atividade com a resposta imunológica produzida (DHAR et al., 2000, 2003). Desse modo, a escolha do promotor é fundamentada em sua aplicação funcional, variando de acordo com a patologia e o sistema de defesa do hospedeiro. Ao conseguirmos definir níveis de expressão ou direcionamento precisos, podemos controlar mais eficientemente a resposta imunológica necessária a uma vacina multivalente.

1.4.3 Gene repórter

Vários gene repórteres clássicos estão disponíveis para estudos em micobactérias, como os genes *lacZ* (BARLETTA et al., 1992; DELLAGOSTIN et al., 1995; TIMM et al., 1994b), *cat* (DAS GUPTA et al., 1993), *xyIE* (CURCIC et al., 1994) e *luc* (GORDON et al., 1994; JACOBS et al., 1993). Mas devido à importância da vida intracelular de espécies de micobactérias patogênicas, fez-se desejável desenvolver abordagens para visualização de micobactérias no interior da célula eucariótica (mais comumente os macrófagos) e para monitorizar a expressão de genes nesses ambientes. Tais conceitos estimularam o desenvolvimento de sistemas repórter com a proteína verde fluorescente (GFP) (Via et al., 1998).

A proteína GFP tem como característica a produção de uma luz verde brilhante fluorescente quando estimulada com a luz ultravioleta (UV) (WARD, 1998). Ela foi descoberta, em 1961, pelo Dr. Osamu Shimomura (SHIMOMURA, 2005) e seu gene foi clonado pela primeira vez por Prasher et al., em 1992, de uma água viva de nome científico *Aequorea victoria*. Inicialmente, a GFP foi usado para observação de células vivas por microscopia de fluorescência, o que permite monitorar a localização de proteínas de interesse e visualizar eventos celulares (MISTELI; SPECTOR, 1997). É uma proteína citoplasmática com baixa toxicidade e síntese contínua, sendo mínimos os efeitos tanto sobre a dinâmica bacteriana quanto da diluição do sinal de fluorescência durante a replicação bacteriana. Outra vantagem da GFP reside no fato de que o fluoróforo faz parte da cadeia peptídica, portanto ela não precisa de nenhum aditivo para fluorescer, ao contrario da aequorina e outras luciferinas, que necessitam de cofatores para a emissão de luz. (CHALFIE et al., 1994).

Kremer et al, em 1995, foram os primeiros a sugerir o uso da GFP em micobactérias, sendo também usado para análise de atividade de promotores (COWLEY et al., 2001). Atualmente, a GFP representa um excelente marcador de expressão *in vivo*, tendo entre outras aplicações a de marcador de células, de compartimentos celulares ou de proteínas específicas. Em fusão com outros produtos gênicos, permite o acompanhamento da trajetória subcelular de muitas proteínas e identificação de regiões promotoras (CASART et al., 2008). Revelou-se o melhor marcador para avaliar a atividade temporal de promotores de micobactérias (KAVITA et al., 2008). A produção de proteínas verdes fluorescentes mutantes, especialmente aquelas com incremento no brilho, foi crucial para a aplicação de *gfp* como gene repórter em muitos estudos. O *enhanced GFP (eGFP)*, por exemplo, é uma proteína mutante muito utilizada, porque apresenta até 35 vezes mais fluorescência que a proteína selvagem (KENDALL et al., 1998).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Construir vetores de expressão micobacterianos a partir do mesmo plasmídeo pLA71 padrão contendo cassetes sob controle de diferentes promotores $P_{\alpha Ag}$, P_{AN} , P_{Blaf^*} , P_{hsp60} e P_{L5} , com o gene *gfp* como gene repórter para avaliar a atividade relativa ou força desses promotores.

2.2 Objetivos Específicos

- Construir vetores de expressão baseados em pLA71 contendo os promotores $P_{\alpha Ag}$, P_{AN} , P_{Blaf^*} , P_{hsp60} e P_{L5} e o gene repórter *gfp*,
- Obter *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG expressando GFP com os plasmídeos construídos;
- Quantificar e comparar por citometria de fluxo a intensidade de fluorescência emitida pelos diferentes transformantes;
- Avaliar estabilidade e atividade *in vitro* e *in vivo* dos diferentes BCG recombinantes;
- Utilizar esses recombinantes como ferramenta para validar métodos de detecção como citometria de fluxo para ser usado em possível localização *in vivo* através de imunização de camundongos.

3 METODOLOGIA

3.1 Bactérias e meios de cultivos

Para as etapas de clonagens foram usadas *E. coli* DH5 α quimiocompetentes e estas mantidas a -80 °C. A seleção de transformantes foi realizada em meio líquido Luria-Bertani (LB), sob agitação constante (250 rpm) ou em meio sólido LB-ágar após incubação por 16 h a 37 °C.

M. smegmatis mc² 155 e *M. bovis* BCG cepa Moreau foram as cepas de micobactérias utilizadas ao longo deste estudo. As bactérias foram mantidas em alíquotas a -80 °C.

Os cultivos líquidos de *M. smegmatis* foram realizados em meio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories - USA) contendo glicerol 0,5% (Sigma) e Tween-80 0,05% (Inlab) – MB7H9, e os cultivos em meio sólido foram realizados em placas de Middlebrook 7H10 (Difco) contendo glicerol 0,5% - MB7H10, e com incubação por 3 a 5 dias a 37 °C.

Os cultivos líquidos de *M. bovis* BCG foram realizados em meio Middlebrook 7H9, contendo glicerol 0,5% e Tween 80 0,05%, suplementado com OADC 10% - MB7H9-OADC, e os cultivos em meio sólido realizados em placas de Middlebrook 7H10 contendo glicerol 0,5% e suplementados com OADC 10% - MB7H10-OADC, e incubadas por até 4 semanas a 37 °C e 5% de CO₂.

O antibiótico canamicina foi adicionado aos meios de cultivo, quando necessário, na concentração de 20 µg/mL.

3.2 Construção dos cassetes de expressão

Para a construção dos cassetes de expressão, as sequencias correspondentes aos diferentes promotores e ao gene repórter *gfp* foram amplificadas por PCR utilizando os seguintes iniciadores:

Quadro 1. Iniciadores usados para amplificação das sequencias correspondentes aos diferentes promotores e ao gene *gfp*:

	Iniciadores	Sítio de Restrição*
<i>gfp</i>	Direto: accgcgggcgcg ggtacc atggtgagcaagggc Reverso: tag gcggccgc cttactgtacagctcgtccatgc	<i>KpnI</i> <i>NotI</i>
$P_{\alpha Ag}$	Direto: tag ggatcc acgactttcgcccgaatcga Reverso: gcccttgctcaccat ggtacc cgcgcccgcggt	<i>BamHI</i> <i>KpnI</i>
P_{AN}	Direto: tag ggatcc gatcccgtagacacggcc Reverso: tag ggtacc cattgagaatctccttctggg	<i>BamHI</i> <i>KpnI</i>
P_{hsp60}	Direto: tag ggatcc ggtgaccacaacgacgcg Reverso: gcccttgctcaccat ggtacc cattgcgaagtgattcctccg	<i>BamHI</i> <i>KpnI</i>
P_{L5}	Direto: tag agatct agaggaaacagctatgaccatg Reverso: gcccttgctcaccat ggtacc catatgcgatctccctt	<i>BglII</i> <i>KpnI</i>

(*) o negrito representa a localização dos sítios de restrição

O gene *gfp* foi amplificado a partir do vetor comercial pEGFP-N1 (Clontech Laboratories), conforme os estudos de Rosa, 2009. Os promotores $P_{\alpha Ag}$ e P_{hsp60} foram amplificados a partir do DNA genômico do *M. bovis* BCG. Os promotores P_{AN} e P_{BlaF^*} já haviam sido previamente clonados no vetor pLA71 pelo Dr. Ivan Pereira Nascimento, pesquisador em nosso laboratório. O promotor P_{L5} foi amplificado a partir de uma construção preexistente no laboratório (ROSA, 2009).

As reações foram realizadas conforme o protocolo da enzima *Taq* DNA Polimerase (Thermo Fisher):

Componentes da reação	Quantidade de cada componente
10X Tampão de reação padrão	2,5 μ L
2 mM $MgCl_2$	2 μ L

10 mM dNTPs	1 μ L
10 μ M iniciador direto	1 μ L
10 μ M iniciador reverso	1 μ L
DNA molde	1-3 μ L
<i>Taq</i> DNA Polimerase	0,25 μ L
Água Milli-Q	até volume final de 25 μ L

A PCR compreendeu as seguintes etapas: 1 ciclo de desnaturação (94 °C por 4 min), 30 ciclos de amplificação (94 °C por 30 s, temperaturas variando entre 54 e 61 °C por 30 s, e 72 °C por 1 min) e 1 ciclo para extensão final (72 °C por 10 min), finalizando a reação a 4 °C em termociclador Eppendorf (MasterCycler gradient). Cada produto de amplificação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, seguido de purificação das bandas específicas de cada região de interesse, usando o kit GFX (GE healthcare).

Os produtos purificados dessa primeira amplificação foram utilizados como moldes para uma segunda PCR, a fim de fusionar o cassete de expressão, segundo a técnica *Double-joint PCR* descrita por Yu et al., em 2004. A PCR foi realizada para um volume final de 25 μ L (seguindo as mesmas proporções de reagentes da primeira PCR), mas com as seguintes etapas: 1 ciclo de desnaturação (92 °C por 2 min), 10 ciclos de amplificação (92 °C por 10 s, temperaturas variando entre 54 e 61 °C por 4 min, e 72 °C por 6 min), e 1 ciclo de extensão final (72 °C por 10 min), finalizando a reação a 4 °C em termociclador Eppendorf (MasterCycler gradient). Para cada reação de fusão foi utilizado o respectivo iniciador direto do promotor e o iniciador reverso do *gfp*. Cada produto de amplificação (cassete fusionado) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, e as bandas específicas de cada região de interesse purificadas usando o kit GFX (GE healthcare).

FIGURA 1. Representação esquemática das etapas de construção dos cassetes de expressão. Uma PCR típica foi realizada a fim de fundir fragmentos de DNA da região promotora e do gene repórter. Iniciadores reversos dos promotores tinham bases de sequência complementar ao *gfp* para sobreposição com a extremidade deste; enquanto o iniciador direto do *gfp* tinha bases de sequência complementar aos promotores para sobreposição com a extremidade destes. As setas representam os iniciadores usados nas PCRs. PCR 1ª etapa: amplificação das regiões promotoras e do gene *gfp*. PCR 2ª etapa: fusão dos fragmentos de *gfp* e dos diferentes promotores, resultando nos cassetes de expressão.

3.3 Subclonagem em pGEM-T Easy

Os cassetes de expressão fusionados ($P\Sigma$) foram subclonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) conforme o protocolo do fabricante:

Componentes da reação	Volume de cada componente
Tampão de Ligação 2X	5 μ L
Vetor pGEM-T Easy	1 μ L
Produto de PCR	3 μ L
T4 DNA Ligase	1 μ L
Volume Final	10 μ L

A reação foi incubada por 16 h a 4 °C. Após esse tempo, bactérias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes foram transformadas com a mistura por choque térmico, conforme descrito por Sambrook.

Uma alíquota de 50 μ L de bactéria competente foi retirada do estoque a -80 °C e descongelada por 15 min sob gelo. O produto de ligação foi misturado à alíquota e deixada sob gelo por 30 min. Após este período, procedeu-se o choque térmico à bactéria incubando a alíquota por 2 min a 42 °C seguido de 3 min sob gelo. Após o choque térmico, 450 μ L de meio LB foi adicionado e pré-incubado por 60 min a 37 °C sob agitação a 250 rpm. Em seguida, a alíquota foi semeada em placas de LB com canamicina que foram incubadas por 16 h a 37 °C.

Após a transformação, 2-3 colônias transformantes foram escolhidas e inoculadas em 3 mL de meio líquido LB com canamicina e incubadas por 16 h a 37 °C. Após esse tempo, os cultivos foram centrifugados a 14000 rpm, a 4 °C por 1 min e os vetores pGEM-P Σ extraídos e purificados através do kit plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare) seguindo orientações do fabricante. A integridade das sequências e a correta inserção nos vetores foram confirmadas por sequenciamento.

3.4 Clonagem no vetor pLA71

Os cassetes de expressão foram digeridos dos vetores pGEM-P Σ com os pares de enzimas de restrição adequadas (*Bam*HI – *Not*I ou *Bgl*II - *Not*I) (New England Biolabs - USA) a 37 °C por 1 h de acordo com as recomendações do fabricante. O vetor pLA71 também foi digerido nas mesmas condições. Cada reação de digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, seguido de purificação das bandas específicas de cada região de interesse, seguindo o protocolo de purificação de DNA do kit GFX (GE healthcare).

Os cassetes de expressão (P Σ) foram clonados no vetor pLA71 conforme o protocolo:

Componentes da reação	Volume de cada componente
Tampão de Ligação 10X	1 µL
Vetor pLA71 linearizado	1 µL
Cassete de Expressão	3 µL
T4 DNA Ligase	1 µL
Água Milli-Q	Até volume final de 10 µL

As reações de ligação foram incubadas a 4 °C por 16 h. Após esse tempo, *E. coli* DH5α quimiocompetentes foram transformadas com os respectivos produtos de ligação, seguindo protocolo descrito por Sambrook, para que os vetores pLA71-PΣ fossem selecionados e expandidos.

FIGURA 2. Representação esquemática do vetor pLA71 utilizado e os cassetes de expressão, formados pelos respectivos promotores e o gene repórter *gfp*. (A) O vetor pLA71 possui, originalmente, o promotor da β-lactamase (P_{BlaF*}), o gene de resistência a canamicina (Kan), origem de replicação em *E. coli* (ori-E. coli) e micobactéria (ori-Myco), além do gene da fosfatase alcalina (*phoA*). (B) Os cassetes de expressão construídos após a fusão dos fragmentos correspondentes aos promotores micobacterianos e o gene *gfp* por PCR.

Algumas colônias transformantes foram inoculadas em meio LB com canamicina para análise por PCR dessas colônias para confirmação de clones

contendo os plasmídeos construídos. As colônias positivas, identificadas por PCR, tiveram seus plasmídeos purificados através do kit plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare) e quantificados no aparelho NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Para comprovação da inserção, os vetores de expressão pLA71-P Σ foram submetidos à análise de restrição e de sequenciamento.

3.5 Micobactérias eletrocompetente

Para geração de *M. smegmatis* eletrocompetente uma única colônia foi inoculada em 5 mL de MB7H9 sob agitação a 250 RPM por 37 °C por até 4 dias, gerando assim o pré-inóculo, que foi utilizado para inocular 50 mL de MB7H9 mantido sob as mesmas condições até chegar a fase exponencial D.O.₆₀₀ 0,6 – 0,8. O cultivo foi mantido por 90 min sob gelo e centrifugado a 4000 rpm a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado duas vezes com 50 mL de glicerol 10% gelado estéril, removendo o sobrenadante por centrifugação nas mesmas condições anteriores. Ao final, o sedimento celular foi ressuspensionado em 1 mL de glicerol 10% e aliquoteado em 100 μ L. As alíquotas foram estocadas a -80 °C até seu uso.

Para geração de *M. bovis* BCG eletrocompetente uma única colônia foi inoculada em 2 mL de MB7H9-OADC e mantida por até 2 semanas a 37 °C e 5% de CO₂, que foi utilizado para inocular 50 mL de MB7H9-OADC mantido sob as mesmas condições até chegar à fase exponencial D.O.₆₀₀ 0,6 – 0,8. O cultivo foi centrifugado a 4000 rpm a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado por três vezes com 50 mL, 10 mL e 5 mL de glicerol 10% gelado estéril, removendo o sobrenadante por centrifugação nas mesmas condições anteriores. Ao final, o sedimento celular foi ressuspensionado em 1 mL de glicerol 10% e aliquoteado em 50 μ L. As alíquotas foram estocadas a -80 °C até seu uso.

3.6 Transformações de *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG

M. smegmatis e *M. bovis* BCG eletrocompetentes foram transformadas com os vetores pLA71-P Σ construídos, seguindo o protocolo de transformação por eletroporação (PARISH; STOKER, 1998). O vetor pLA71 sem cassete de expressão também foi inserido em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG para controle da reação de transformação.

Para a transformação de micobactéria, 1-3 μ L de cada plasmídeo construído foi misturado a uma alíquota de bactéria competente (descongelada em gelo por 10 min) em uma cubeta de eletroporação de 2 mm (BTX Harvard) e submetida à eletroporação a 2,5 kV, 25 μ F e 1000 Ω em eletroporador de pulsação Gene Pulser II (BioRad). A eficiência da eletroporação foi monitorada observando a constante de tempo, usualmente entre 19 – 21 ms para *M. smegmatis* e 17 – 19 ms para BCG. Após o pulso, a cubeta foi devolvida ao gelo por 10 min.

M. smegmatis eletroporadas foram ressuspensas em 2 mL de MB7H9 e pré-incubadas a 37 °C por 2 h. O inóculo foi distribuído em placas MB7H10 com canamicina e incubadas de 3 a 5 dias a 37 °C até o aparecimento de colônias visíveis. Entre 2-5 colônias transformantes de *M. smegmatis* para cada construção plasmidial foram inoculadas em 5 mL de MB7H9, com canamicina, e incubadas a 37 °C por até 4 dias, para analisar a expressão de GFP por citometria de fluxo.

Já os BCG eletroporados foram ressuspensos em 1 mL de MB7H9-OADC e pré-incubadas a 37 °C por 16 h. O inóculo foi distribuído em placas MB7H10-OADC com canamicina e incubadas por 3-4 semanas a 37 °C e 5% de CO₂ até o aparecimento de colônias visíveis. Entre 2-5 colônias transformantes de BCG para cada construção plasmidial foram inoculadas em 2 mL de MB7H9-OADC, com canamicina, e incubadas por uma semana a 37 °C e 5% CO₂, gerando assim o pré-inóculo, que foi utilizado para inocular 40 mL de MB7H9-OADC, com canamicina, mantido sob as mesmas condições por até duas semanas atingindo a fase exponencial D.O.₆₀₀ 0,8 – 1,0. O cultivo foi utilizado para analisar a expressão de GFP por citometria de fluxo e para as preparações vacinais.

Para as preparações vacinais, o cultivo foi centrifugado e lavado por 3 vezes com 20 mL de Água Milli-Q gelada estéril e centrifugada a 4000 rpm por 10 min. Ao final, o pellet foi ressuspendido em 1 mL de glicerol 10% gelado estéril e as alíquotas de 100 µL estocadas a -80 °C.

3.7 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas de 5 a 7 semanas de idade, obtidos do biotério de criação da Faculdade de Medicina (FMUSP) foram utilizados em ensaios *in vivo* de estabilidade e localização dos BCG recombinantes. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação animal do Laboratório de Biotecnologia Molecular IV segundo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUA/IB) sob o protocolo 1264/14.

3.8 Ensaio *in vitro* com BCG recombinantes

3.8.1 Infecção de macrófagos

Células RAW 264.7 (linhagem de macrófagos) foram cultivadas em RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco), a 37 °C numa atmosfera úmida de 5% de CO₂.

Os macrófagos foram semeados em garrafas de cultivo e deixados aderir por 18 h. Após esse tempo, foram infectados com BCG e BCG recombinante a uma multiplicidade de infecção (M.O.I.) 1:10 (um macrófago para cada 10 bacilos) por 3 h. Depois, os macrófagos foram lavados duas vezes com PBS 1 X para remoção das micobactérias não fagocitadas e incubados em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. Decorridos 24 h de incubação, os macrófagos foram ressuspendidos

com auxílio de um raspador de células estéril para serem centrifugados e lavados com PBS 1 X para análise em citometria de fluxo.

Os macrófagos também foram semeados em placa de 12 poços (1×10^6 células/poços) contendo lamínulas arredondadas e deixadas a aderir durante 18 h. Os macrófagos foram infectados com BCG e BCG recombinante a M.O.I. 1:10. Após 3 h de infecção, os macrófagos foram lavados duas vezes com PBS 1 X para remoção das micobactérias não fagocitadas e incubados durante mais 24 h em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. Após este tempo, lâminas foram preparadas seguindo o protocolo: os macrófagos foram fixados com paraformaldeído 4% durante 20 min à temperatura ambiente; lavados três vezes com PBS 1 X; permeabilizados com solução Triton X-100 0,1%, à temperatura ambiente durante 15 min; bloqueados com solução BSA 1% contendo RNase (100 µg/mL) durante 60 min a 37 °C; incubados com iodeto de propídeo (20 µg/mL) diluído em solução BSA 1%, durante 60 min no escuro. As lâminas foram montadas com o kit ProLong® antifade (Life Technologies) e analisadas em microscopia confocal.

3.9 Ensaios *in vivo* com BCG recombinantes

3.9.1 Estabilidade

Fêmeas BALB/c de 5 a 7 semanas de foram inoculadas com BCG recombinante na concentração de 1×10^6 UFC/animal por via intraperitoneal. Após 30 dias, o baço dos camundongos foi extraído, assepticamente, macerado em meio RPMI 1640 e plaqueado em meio MB7H10-OADC, com ou sem antibiótico canamicina, para análise de estabilidade do plasmídeo.

3.9.2 Localização

Fêmeas BALB/c de 5 a 7 semanas de foram imunizadas com BCG e BCG recombinante na concentração de 1×10^6 UFC/animal por vias subcutânea (na região peritoneal), intradérmica ou intratraqueal. Para determinação de UFC, camundongos foram sacrificados depois de 1, 3 e 7 dias de inoculação e os respectivos linfonodos inguinais e pulmões removidos assepticamente.

Os linfonodos inguinais foram colocados em meio RPMI 1640 para serem macerados, em seguida, centrifugados a 1100 rpm por 5 min e as células ressuspensas em PBS 1 X.

Os pulmões foram perfundidos através da infusão de 10 mL de PBS 1 X no ventrículo direito do coração para minimizar a interferência de células do sangue. Após remoção, foram picados com bisturis e depois incubados em RPMI 1640 com Colagenase (2 mg/mL) durante 15-20 min a 37 °C. A homogeneização foi feita em peneiras (*cell strainer* 70 μ m – BD-USA) e o homogenato centrifugado a 1100 rpm por 5 min para a remoção de agregados.

Células viáveis, tanto de linfonodos inguinais quanto de pulmão, foram contadas por exclusão com *Trypan Blue* em câmara de Neubauer. Alíquotas de 50 μ L foram plaqueadas em meio MD7H10-OADC, para contagem de UFC recuperados.

Para análise por citometria de fluxo, as células de pulmão foram incubadas com anticorpos monoclonais para CD11b (M1/70), I-A/I-E (M5/114.15.2) e Ly6G (1A8), todos da BD Biosciences (New Jersey, EUA). Os anticorpos eram marcados com PE, PerCP-Cy 5,5 e APC, respectivamente. O protocolo de marcação utilizado foi: adicionar 0,5 μ L de anticorpos sobre 100 μ L de células (1×10^6 células/mL) e incubar por 20-30 min a 4 °C, na ausência de luz. Após o período de incubação, as células foram lavadas com tampão de marcação e centrifugadas a 1100 rpm por 5 min. Para a leitura das amostras, as células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS 1 X e fixadas em paraformaldeído 2%. As células foram captadas em FacsCanto II e pelo menos 10^5 eventos foram adquiridos por amostra. A análise dos dados foi realizada com o *software FlowJo*.

Para análise em microscopia confocal laminae foram preparadas seguindo o protocolo: as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 20 min à temperatura ambiente; lavadas três vezes com PBS 1 X; permeabilizadas com solução Triton X-100 0,1%, à temperatura ambiente

durante 15 min; bloqueadas com solução BSA 1% contendo RNase (100 µg/mL) durante 60 min a 37 °C; incubadas com iodeto de propídeo (20 µg/mL) diluído em solução BSA 1%, durante 60 min no escuro. As lâminas foram montadas com o kit ProLong® antifade (Life Technologies).

3.10 Análise de fluorescência

3.10.1 Citometria de Fluxo

Nas análises de fluorescência por citometria de fluxo foi utilizado o aparelho FACSCanto II (BD Biosciences). O sistema óptico consiste de uma fonte de excitação com três lasers: azul (488 nm), vermelho (633 nm) e violeta (405 nm).

3.10.2 Microscopia

Nas análises de fluorescência por microscopia foi utilizado o microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E200 e o microscópio confocal LSM 510 META, sob a responsabilidade do técnico Henrique Krambeck Rofatto (Processo FAPESP 00/11624-5).

4 RESULTADOS

4.1 Construção dos cassetes de expressão

Com o objetivo de clonar o gene *gfp* sob o controle de diferentes promotores, alguns cassetes de expressão foram desenhados para serem inseridos no vetor pLA71 (Figura 2A), escolhido como esqueleto comum para todas as construções.

O gene que codifica a proteína verde fluorescente foi amplificado por PCR com sucesso e o produto da PCR posteriormente purificado (Figura 3).

FIGURA 3. Gel de agarose contendo o produto de amplificação por PCR do gene da proteína fluorescente verde (*gfp*). 1. Controle da reação, 2-3. Gene *gfp* amplificado(720 pb).

Os promotores $P_{\alpha Ag}$ e P_{hsp60} foram amplificados por PCR a partir de DNA genômico de *M. bovis* BCG com sucesso, 210 pb e 378 pb respectivamente, e

os produtos de PCR posteriormente purificados (Figura 4). O promotor P_{L5} foi amplificado a partir de uma construção preexistente no laboratório, com 263 pb (Figura 4).

FIGURA 4. Gel de agarose contendo o produto de amplificação por PCR dos diferentes promotores. 1. $P_{\alpha Ag}$ (210 pb), 2; P_{hsp60} (378 pb) e 3. P_{L5} (263 pb).

Os produtos das primeiras PCR (promotores e *gfp*), depois de purificados, foram utilizados para a realização da segunda rodada de PCR, onde ocorreu a fusão dos fragmentos, dando origem aos seguintes cassetes de expressão: $P_{\alpha Ag}$ -*gfp*, P_{hsp60} -*gfp* e P_{L5} -*gfp*. Os produtos resultantes tinham os respectivos tamanhos: 930 pb correspondente ao cassete $P_{\alpha Ag}$ -*gfp* (Figura 5), 1098 pb correspondente ao cassete P_{hsp60} -*gfp* e 983 pb correspondente ao cassete P_{L5} -*gfp* (Figura 5).

FIGURA 5. Gel de agarose contendo os produtos das fusões por *Double-joint* PCR dos diferentes promotores com o *gfp*. 1-3: cassete $P_{\alpha Ag}$ -*gfp* (930 pb), 4-6: cassete P_{L5} -*gfp* (983 pb).

Após purificação, os cassetes de expressão fusionados foram subclonados em pGEM para que a integridade das sequências e a correta inserção fossem confirmadas por sequenciamento.

4.2 Clonagem no vetor pLA71

Após confirmação por sequenciamento, os cassetes construídos foram digeridos, individualmente, dos respectivos vetores (pGEM-P Σ) e inseridos no vetor pLA71, obtendo os vetores de expressão pLA71-P $_{\alpha Ag}$ -*gfp*, pLA71-P $_{hsp60}$ -*gfp* e pLA71-P $_{L5}$ -*gfp*. Os plasmídeos pLA71-P $_{AN}$ -*gfp* e pLA71-P $_{Blaf}$ -*gfp*, receberam somente o gene *gfp*, pois os promotores já se encontravam clonados no vetor pLA71.

Os vetores de expressão pLA71-P Σ foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I para análise de inserção do promotor e para análise de inserção do *gfp* foram utilizados as enzimas *Kpn*I e *Not*I. Já para análise de inserção do cassete de expressão foram utilizadas as enzimas *Bam*HI e *Not*I. No caso do plasmídeo pLA71-P $_{L5}$ -*gfp* a enzima *Bam*HI foi substituída pela enzima *Bgl*II que é compatível para o mesmo sitio. Abaixo, a Figura 6 ilustra a metodologia aplicada ao plasmídeo pLA71-P $_{AN}$ -*gfp* como parâmetro para as análises de restrição das demais construções.

FIGURA 6. Análise de restrição do plasmídeo pLA71-P_{AN}-gfp para confirmação da clonagem do cassete de expressão. 1. Plasmídeo pLA71-P_{AN}-gfp linearizado, 2. Análise de inserção do cassete de expressão P_{AN}-gfp (882 pb) através das enzimas de restrição *Bam*H I e *Not* I, 3. Análise da presença do gene *gfp* (720 pb) no cassete de expressão através das enzimas de restrição *Kpn* I e *Not* I. 4. Análise da presença do promotor P_{AN} (162 pb) no cassete de expressão inserido no plasmídeo através das enzimas de restrição *Bam*H I e *Kpn* I.

Colônias *E. coli* DH5α transformadas com os diferentes vetores(pLA71-pΣ) foram analisadas por microscopia de fluorescência, mas não apresentaram emissão de fluorescência, salvo a construção pLA71-P_{L5}-gfp. Esse resultado foi comprovado através de citometria de fluxo, como mostra a Figura 7.

FIGURA 7. Análise da expressão de GFP em *E. coli* DH5α transformadas com as diferentes construções de pLA71-pΣ. Vários clones de cada construção foram selecionados e cultivados em meio líquido LB contendo canamicina. Como controle negativo, foi utilizada uma *E. coli* DH5α não transformada. As análises foram feitas por citometria de fluxo e os dados analisados por *software* Flowjo. Nessa figura foi escolhida uma única análise como representativa dos vários clones. Somente a bactéria transformada com o plasmídeo pLA71- P_{L5} -gfp apresentou emissão de fluorescência.

4.3 Transformações de *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG

Micobactérias transformadas com os vetores pLA71-pΣ foram analisadas por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo para comparação da atividade dos promotores através da expressão de GFP.

Foram selecionados 5 clones de cada construção, exceto do plasmídeo pLA71- P_{L5} -gfp que não foi possível obter transformantes, tanto de *M. smegmatis* quanto de BCG. A expressão de GFP manteve-se uniforme entre as diferentes colônias de um mesmo clone de cada construção, tanto em *M. smegmatis* quanto em *M. bovis* BCG, como podemos ver nas Figuras 8 e 9.

FIGURA 8. Expressão de GFP em *M. smegmatis* transformados com os diferentes vetores de expressão pLA71-pΣ. *M. smegmatis* foram transformadas com os diferentes vetores e cinco clones de cada transformante analisados por citometria de fluxo. (A) pLA71- $P_{\alpha Ag}$ -gfp, (B) pLA71- P_{Blaf} -gfp, (C) pLA71- P_{AN} -gfp e (D) pLA71- P_{hsp60} -gfp. Como controle negativo, foi utilizado *M. smegmatis* nativa. Não houve variação significativa na expressão de GFP entre os clones selecionados de cada construção.

FIGURA 9. Expressão de GFP em *M. bovis* BCG transformados com os diferentes vetores de expressão pLA71-p Σ . BCG competentes foram transformadas com os diferentes vetores e cinco clones de cada transformação selecionados e analisados por citometria de fluxo. (A) pLA71-P $_{\alpha Ag}$ -gfp, (B) pLA71-P $_{BlaI}$ -gfp, (C) pLA71-P $_{AN}$ -gfp e (D) pLA71-P $_{hsp60}$ -gfp. Como controle negativo foi utilizado BCG nativo. Não houve variação significativa na expressão de GFP entre os clones selecionados de cada construção.

Também comparamos a emissão de fluorescência em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG transformadas com as construções estudadas (Figura 10). Verificamos uma escala de emissão que vai de fraca (pLA71-P $_{\alpha Ag}$ -gfp), média (pLA71-P $_{AN}$ -gfp e pLA71-P $_{hsp60}$ -gfp) e alta (pLA71-P $_{BlaI}$ -gfp) nas colônias *M. smegmatis*. Alguns resultados não se repetem em BCG. Verificamos uma escala de emissão que vai de fraca (pLA71-P $_{\alpha Ag}$ -gfp), média (pLA71-P $_{AN}$ -gfp), alta (pLA71-P $_{BlaI}$ -gfp) e muito alta (pLA71-P $_{hsp60}$ -gfp) nas colônias *M. bovis* BCG.

FIGURA 10. Expressão de GFP em *M. smegmatis* (A) ou BCG (B) transformadas com os diferentes vetores de expressão pLA71-p Σ . Um clone representativo das figuras anteriores foi selecionado para comparação da expressão de GFP regulada pelos diferentes promotores. Como controle negativo, foram analisadas micobactérias nativas. (A) *M. smegmatis* transformados com os vetores pLA71-p Σ e (B) *M. bovis* BCG transformados com os vetores pLA71-p Σ .

Realizamos teste ANOVA para comparação estatística das médias entre os diferentes grupos experimentais (Figuras 11 e 12) e confirmar esses dados.

FIGURA 11. Análise estatística dos diferentes clones de *M. smegmatis* expressando GFP após transformação com os plasmídeos pLA71-pΣ. Clones de cada *M. smegmatis* recombinantes (N= 5) transformados com os plasmídeos pLA71-P_{Ag}-gfp, pLA71- P_{AN}-gfp, pLA71- P_{Blaf}-gfp e pLA71-P_{hsp60}-gfp foram cultivados em meio líquido e analisados individualmente por citometria de fluxo. Como controle negativo foi utilizado *M. smegmatis* não transformado. Teste ANOVA foi utilizado para comparação estatística das médias entre os diferentes grupos experimentais. * P < 0,0001 em relação ao controle, ** P < 0,0001 em relação ao pLA71-P_{AN}-gfp, *** P < 0,0001 em relação ao pLA71-P_{hsp60}-gfp. Barras são a média mais o desvio padrão de cinco colônias.

FIGURA 12. Análise estatística dos diferentes clones de *M. bovis* BCG expressando GFP após transformação com os plasmídeos pLA71-pΣ. Clones de cada *M. bovis* BCG

recombinantes (N= 5) transformados com os plasmídeos pLA71-P α Ag-*gfp*, pLA71- PAN-*gfp*, pLA71- PBlaf*-*gfp* e pLA71-P*hsp60*-*gfp* foram cultivados em meio líquido e analisados individualmente por citometria de fluxo. Como controle negativo foi utilizado *M. bovis* BCG não transformado. Teste ANOVA foi utilizado para comparação estatística das médias entre os diferentes grupos experimentais. * P < 0,0001 em relação ao controle, ** P < 0,0001 em relação ao pLA71-P_{AN}-*gfp*, *** P < 0,0001 em relação ao pLA71-P_{Blaf*}-*gfp*. Barras são a média mais o desvio padrão de cinco colônias.

4.4 Ensaio *in vitro* com BCG recombinantes

4.4.1 Infecção de macrófagos

Em relação ao ensaio *in vitro*, macrófagos RAW 264.7 foram infectados com BCG e rBCG pLA71-P_{*hsp60*}-*gfp* para análise em citometria de fluxo. Foram comparados os perfis de fluorescência entre três grupos: macrófagos não infectados, macrófagos infectados com BCG e macrófagos infectados com BCG recombinante. O primeiro e o segundo grupos são controles de autofluorescência dos macrófagos (infectados ou não com BCG) (Figura 13).

FIGURA 13. Análise de fluorescência em cultivo de macrófagos, linhagem RAW 264.7, após infecção com BCG e rBCG pLA71-P_{*hsp60*}-*gfp*. BCG ou BCG recombinante transformado com o vetor pLA71-P_{*hsp60*}-*gfp* foi utilizado para infecção de macrófagos com um M.O.I. de 10:1 por 3 h. Os macrófagos foram lavados para remoção de micobactérias extracelulares, cultivados por 24 h e analisados por citometria de fluxo. (A) Macrófagos não infectados; (B) Macrófagos infectado com BCG e (C) Macrófago infectado com rBCG pLA71-P_{*hsp60*}-*gfp*.

Descartando os percentuais de possível fluorescência inespecífica nos dois primeiros grupos (números apresentados em Q3), obtemos uma taxa de aproximadamente, 50% de macrófagos fluorescentes, devido à presença de BCG recombinante internalizado.

Macrófagos infectados com BCG ou os diferentes BCG recombinantes (rBCG pLA71- P_{AN} -*gfp*, rBCG pLA71- P_{BlaF} -*gfp* e rBCG pLA71- P_{hsp60} -*gfp*) foram analisados por microscopia confocal, corados ou não com iodeto de propídeo. Nas Figuras 14 e 15, podemos observar bacilos fagocitados e fluorescentes.

FIGURA 14. Macrófagos RAW 264.7 infectados com BCG ou BCG recombinantes. rBCG pLA71- P_{hsp60} -*gfp* e rBCG pLA71- P_{BlaF} -*gfp* foram utilizados para infecção de macrófagos com um M.O.I. de 10:1 por 3 h. Os macrófagos foram lavados para remoção de micobactérias extracelulares, cultivados por 24 h e corados com iodeto de propídeo (IP) e em seguida analisados por microscopia confocal. (A) Macrófagos infectados com BCG; (B) Macrófagos infectados com rBCG pLA71- P_{hsp60} -*gfp*; (C) Macrófagos infectados com rBCG pLA71- P_{BlaF} -*gfp*. Barra de escala representa 10µm. Imagens tiradas com lente objetiva 63x e processadas com Zeiss LSM 510 software.

O iodeto de propídeo (IP) se liga as cadeias de DNA, e é usado para avaliar a integridade da membrana plasmática. Com o uso de IP, podemos ver os bacilos internalizados marcados com a cor vermelha, expressando ou não *gfp*. Além disso, podemos perceber bacilos de coloração amarela, efeito da sobreposição das cores vermelho e verde. Os bacilos que incorporaram o iodeto de propídeo indica que possuem degradações na membrana o que pode significar a morte da bactéria.

FIGURA 15. Macrófagos (RAW 264.7) infectados com BCG ou BCG recombinantes. rBCG pLA71-P_{AN}-*gfp*, rBCG pLA71-P_{BlaF₃}-*gfp* e rBCG pLA71-P_{hsp60}-*gfp* foram utilizados para infecção de macrófagos (M.O.I. 10:1) por 3 h. Os macrófagos foram lavados para remoção de micobactérias extracelulares, cultivados por 24 h e analisados por microscopia confocal. (A) Macrófagos infectados com BCG; (B) Macrófagos infectados com rBCG pLA71-P_{AN}-*gfp*; (C) Macrófagos infectados com rBCG pLA71-P_{BlaF₃}-*gfp*; (D) Macrófagos infectados com rBCG pLA71-P_{hsp60}-*gfp*. Barra de escala representa 20µm. Imagens tiradas com lente objetiva 63x e processadas com Zeiss LSM 510 software.

Pode-se observar que a expressão de GFP pelos promotores P_{AN} , P_{hsp60} e P_{BlaF^+} não impediu a fagocitose dos respectivos BCG recombinantes pelos macrófagos. Não foram feitos ensaios de infecção de macrófagos com BCG transformado com o vetor pLA71- $P_{\alpha Ag}$ -gfp devido a baixa expressão de GFP pelo bacilo.

4.5 Ensaios *in vivo* com BCG recombinantes

4.5.1 Estabilidade

O ensaio de estabilidade *in vivo* foi realizado com dois BCG recombinantes diferentes, um contendo o promotor mais fraco (rBCG pLA71- P_{AN} -gfp) e outro com o promotor mais forte (rBCG pLA71- P_{hsp60} -gfp). Após 30 dias da inoculação por via intraperitoneal, o baço dos camundongos foi retirado, processado e plaqueado em meio MB7H10-OADC, com ou sem canamicina. Decorridas 3-4 semanas, foi realizada a contagem de UFC recuperadas nas placas. A diferença entre UFC recuperado nas placas com ou sem antibiótico não foi significativa, em ambas as construções (Figura 16).

FIGURA 16. Análise da estabilidade dos BCG recombinantes após inoculação em camundongos. Fêmeas BALB/c, de 5 a 7 semanas, foram inoculados com BCG recombinantes na concentração de 1×10^6 UFC/animal pela via intraperitoneal. Após 30 dias, o baço dos camundongos foi extraído, homogeneizado e diluído sucessivamente para então serem plaqueados em meio com ou sem canamicina (Can) para determinação da unidade formadora de colônias (UFC). As barras mostram a média mais o desvio padrão de 5 animais por cada experimento.

4.5.2 Localização

Por citometria, o nível de fluorescência emitida pelo bacilo recombinante quando internalizado nos macrófagos apresentou uma queda de quase um *log* (Figura 17). Assim, para os ensaios de localização *in vivo*, foi utilizado um BCG transformado com o vetor integrativo pJH223, contendo o cassete de expressão P_{L5} -gfp (Rosa, 2009), o qual se mostrou mais forte que os demais utilizados nos BCG recombinantes construídos no presente estudo (Figura 18).

FIGURA 17. Análise comparativa entre a fluorescência emitida pela expressão de GFP em BCG recombinante em cultivo e após internalização por macrófagos. (A) rBCG pLA71-P_{hsp60}-gfp foi cultivado em meio líquido e alguns clones (N=5) analisados por citometria de fluxo. (B) rBCG pLA71-P_{hsp60}-gfp internalizado por macrófagos (MOI 10:1).

FIGURA 18. Análise comparativa entre a intensidade de fluorescência emitida por GFP expressa em duas construções de BCG recombinantes. O rBCG pLA71-P_{hsp60}-gfp foi analisada por citometria de fluxo e o nível de expressão de GFP comparado com outro BCG recombinante contendo um vetor integrativo (rBCG pJH223-P_{L5}-gfp). Como controle negativo, foi usado um BCG nativo.

Camundongos fêmeas BALB/c foram imunizados com BCG ou BCG recombinante por 2 vias (subcutânea e intradérmica). Após 1, 3 e 7 dias de inoculação, três camundongos foram sacrificados, seus pulmões e linfonodos inguinais extraídos e processados para análises.

Os homogenatos de pulmões e linfonodos inguinais foram plaqueados em MB7H10-OADC para contagem de UFC recuperado. Pela via de inoculação subcutânea, foi possível recuperar BCG nativo nos três tempos de análise, e rBCG pJH223- P_{L5} -*gfp*, em dois tempos (Figura 19). A diferença na quantidade de UFC nos diferentes pontos não foi significativa. Já nos pulmões, foi possível recuperar BCG e rBCG pJH223- P_{L5} -*gfp* nos dois tempos iniciais (Figura 19).

FIGURA 19. Cinética de recuperação de BCG e BCG recombinante no linfonodo e pulmão após imunização subcutânea. Fêmeas BALB/c, de 5 a 7 semanas, foram imunizadas com BCG e rBCG pJH223- P_{L5} -*gfp* (rBCG) na concentração de 1×10^6 UFC/animal pela via subcutânea. Após 1, 3 e 7 dias, os linfonodos inguinais e os pulmões foram extraídos,

homogeneizados e plaqueados para determinação de UFC. Os dados mostram UFC médio entre 3 animais.

Pela via de inoculação intradérmica, também foi possível recuperar BCG no pulmão, mas apenas no primeiro tempo (1 dia após imunização), sendo que a quantidade recuperada foi a mesma que na via subcutânea (1×10^3 UFC) (dado não mostrado).

Os homogenatos de pulmões foram marcados com os anticorpos contra CD11b (PE), I-A/I-E (PerCP-Cy 5,5) e Ly6G (APC) para análises por citometria. Através dessas marcações, selecionamos duas subpopulações: macrófagos, com perfil $CD11b^+Ly6G^-$; e neutrófilos, com perfil $CD11b^+Ly6G^+$. Utilizamos células de pulmão de camundongo não inoculado e marcadas com os anticorpos de interesse, como controle negativo ou de autofluorescência (Figura 20).

FIGURA 20. Definição das subpopulações celulares de Macrófago e Neutrófilo no homogenato de pulmão através de seus respectivos marcadores CD11b e Ly6G. Homogeneizado de pulmão de fêmea BALB/c não inoculada foi utilizado para controle das análises, marcado com os anticorpos anti-CD11b (PE) e anti-Ly6G (APC) para seleção de subpopulação de macrófagos e neutrófilos, respectivamente. Inicialmente, seleção da população de interesse por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Em seguida, cruzamento

entre as marcações por anti-CD11b (PE) e anti-Ly6G (APC). Por fim, análise de fluorescência da subpopulação CD11b+Ly6G+ (neutrófilo) e da subpopulação CD11b+Ly6G- (macrófago).

A partir disso, construímos os histogramas referentes à comparação de neutrófilos e de macrófagos possivelmente infectados com rBCG pJH223-P_{L5}-gfp após 1, 3 e 7 dias de inoculação.

FIGURA 21. Análise de fluorescência emitida por GFP pela subpopulações de macrófagos e neutrófilos em homogenato de pulmão de camundongos imunizados (s.c. ou i.d.) com rBCG pJH223-P_{L5}-gfp após 1 dia. Fêmeas BALB/c, de 5 a 7 semanas, foram imunizadas com 1×10^6 UFC/animal com BCG ou rBCG pJH223-P_{L5}-gfp (rBCG) pelas vias subcutânea ou intradérmica. Após 1 dia, os pulmões foram extraídos, homogeneizados e marcados com os anticorpos anti-CD11b e anti-Ly6G para análise de fluorescência por GFP nas subpopulações de macrófagos e neutrófilos.

Na Figura 20, onde demonstramos a estratégia de análise usada no software FlowJo, observamos uma população FITC-A+ tanto para a população de macrófagos (7,14%) quanto para a população de neutrófilos (18,8%) de pulmão de animais não imunizados. Esses valores foram considerados possíveis autofluorescência das populações.

Na Figura 21, quando comparamos os valores das populações FITC-A+ de macrófagos e de neutrófilos dos animais imunizados com BCG (s.c.) (6,85%; 22,3%), rBCG (i.d.) (13,0%; 11,4%) ou rBCG (s.c.) (16,9%; 14,9%) não encontramos diferenças entre eles, e assemelham-se aos valores referentes a autofluorescência dessas células pulmonares. Essa relação se repete nos dias 3 e 7 após imunização (dados não mostrados).

Também foram utilizados os rBCG pLA71- P_{AN} -*gfp* e rBCG pLA71- P_{hsp60} -*gfp* nos ensaios de localização, mas não encontramos diferenças entre os resultados obtidos entre os três BCG recombinantes usados (dados não mostrados). A alta taxa de autofluorescência das células de pulmão de camundongos imunizados ou não com BCG acabou dificultando as análises das subpopulações de neutrófilos e macrófagos possivelmente infectados com BCG recombinante.

Para complementar os resultados de citometria e contagem de UFC, foram confeccionadas lâminas para análise em microscopia confocal. Os homogenatos de pulmões foram marcados com iodeto de propídeo. Observamos na Figura 22, a presença de bacilos fluorescentes no homogenato de linfonodos 3 e 7 dias após imunização. Também foi possível observar bacilos fluorescentes em homogenato de pulmões 3 dias após imunização.

FIGURA 22. Microscopia confocal de homogenatos de pulmão e de linfonodo inguinal de camundongos inoculados com BCG recombinante expressando GFP. Fêmeas BALB/c foram imunizadas com rBCG pJH223- P_{L5} -*gfp* na concentração de 1×10^6 UFC/animal por via subcutânea (na região peritoneal). Três camundongos foram sacrificados depois de 1, 3 e 7 dias de imunização e os respectivos linfonodos e pulmões removidos assepticamente para serem processados. Os homogenatos foram corados com iodeto de propídeo. (A) Linfonodos após 3 dias de imunização; (B) Linfonodos após 7 dias de imunização; (C) Pulmões após 3 dias de imunização. Imagens tiradas com lente objetiva 63x e processadas com Zeiss LSM 510 software.

Fizemos também um ensaio para determinar a presença de rBCG pJH223- P_{L5} -*gfp* no pulmão de camundongos após 1 dia da imunização pela via intratraqueal. Os homogenatos de pulmões foram marcados com os mesmos anticorpos contra CD11b (PE), I-A/I-E (PerCP-Cy 5,5) e Ly6G (APC), para análise por citometria de fluxo. Novamente observamos uma elevada taxa de autofluorescência das células de pulmão de camundongos imunizados com BCG nativo, dificultando as análises das subpopulações de neutrófilos e macrófagos possivelmente infectados com BCG recombinante (dado não mostrado). Mas por microscopia confocal, a partir de lamina coradas com iodeto de propídeo, foi possível observar bacilos fluorescentes (Figura 23).

FIGURA 23. Microscopia confocal de homogenatos de pulmões de camundongos inoculados com BCG recombinante expressando GFP. Fêmeas BALB/c foram imunizadas com rBCG pJH223-P_{L5}-gfp na concentração de 1×10^6 UFC/animal por via intratraqueal. Dois camundongos foram sacrificados após 1 de imunização e os pulmões removidos assepticamente para serem processados. Os homogenatos foram corados com iodeto de propídeo. Barra de escala representa 10μm. Imagens tiradas com lente objetiva 63x e processadas com Zeiss LSM 510 software.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Diversos estudos tem mostrado o papel fundamental do uso de promotores em sistemas de expressão com o intuito de melhorar o nível de expressão de antígenos ou candidatos vacinais em veículos vivos para apresentação de antígenos heterólogos. No caso de vetores vivos como BCG não é diferente (BASTOS et al., 2009). A importância do promotor como elemento que regula o nível de produção do antígeno é um fator determinante para a indução de uma resposta imunológica adequada (DHAR et al., 2003). Portanto, o uso de promotores fortes ou a melhor caracterização de promotores já existentes é visto como um mecanismo chave para solucionar problemas de expressão, tais como a expressão nula ou baixa expressão dos diferentes antígenos.

No presente estudo, foi proposto avaliar a força de quatro promotores de micobactérias - $P_{\alpha Ag}$, P_{AN} , P_{BlaF^*} e P_{hsp60} – e o promotor de micobacteriófago, P_{L5} , em um mesmo vetor estrutural, através dos níveis de expressão de GFP em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG. Embora a força desses promotores possa ser considerada entre fraca, média e forte, não há de fato um estudo sistemático caracterizando esses promotores num mesmo vetor ou plasmídeo como esqueleto padrão e com um mesmo gene sob o controle de cada promotor para de fato determinar a força de cada um individualmente. Pensando nisso, decidimos estudar ou caracterizar esses vários promotores num mesmo vetor.

Nossa estratégia foi usar o vetor pLA71 como esqueleto dos cassetes de expressão, contendo o gene *gfp*, sob o controle dos diferentes promotores e como repórter do nível de expressão. A escolha do vetor pLA71 levou em consideração um importante aspecto: esse vetor tem sido amplamente utilizado em nosso laboratório e foi usado para a construção de uma vacina baseada em BCG recombinante (rBCG-Pertussis) (NASCIMENTO et al., 2000), que atingiu níveis elevados do antígeno e com estabilidade de expressão e que está sendo produzida em boas práticas de manufatura (GMP) e sem resistência a antibiótico. Essa será testada em breve num ensaio clínico.

Inicialmente, decidimos primeiro clonar os promotores no vetor pLA71, para em seguida clonar o gene *gfp*. No entanto, esse caminho se mostrou difícil, devido aos tamanhos pequenos dos insertos ou promotores, que depois de digeridos do pGEM-T Easy tinham um rendimento muito baixo após purificação, dificultando assim a clonagem no vetor pLA71. Conseguimos construir dessa forma apenas dois plasmídeos: pLA71- P_{AN} -*gfp* e pLA71- P_{Blaf} -*gfp*. Decidimos então construir os cassetes de expressão (promotor mais o gene *gfp*) por PCR e subcloná-los no vetor pGEM-T Easy para, em seguida, digeri-los e cloná-los no vetor pLA71. A construção dos cassetes de expressão foi realizada por PCR em duas etapas ou método de *Double-joint*, como descrito por Yu et al, 2004. Utilizando essa estratégia, foi possível construir os cassetes $P_{\alpha Ag}$ -*gfp*, P_{hsp60} -*gfp* e P_{L5} -*gfp*.

Uma vez que usamos um gene que produz uma proteína fluorescente como repórter, decidimos testar se o mesmo poderia ser usado como método de seleção de transformantes positivos em *E. coli*. Os produtos de ligação dos cassetes inseridos no vetor pLA71 foram usados para transformar *E. coli* DH5 α . Foi possível observar colônias fluorescentes transformadas apenas com o plasmídeo pLA71- P_{L5} -*gfp*. Das Gupta et al. (1993) estudaram sinais de transcrição de micobactérias e revelaram que promotores de micobactérias funcionam de forma “pobre” em *E. Coli*. Bashyam et al. (1996) comprovaram que as RNA polimerases de *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG reconhecem elementos promotores com eficiências comparáveis, tendo os sinais de transcrição semelhantes com os promotores de *Streptomyces*, mas diferem dos de *E. coli* devido às diferenças nas regiões -35 dos promotores e o domínio de ligação correspondente ao fator sigma. Nesbit, et al. (1995) identificaram três promotores no micobacteriófago L5, sendo que dois deles são reconhecidos pela RNA polimerase de *E. coli*. Estes autores também mencionam a presença do promotor P_{L5} ou P_{left} , mas não se faz referência se o mesmo é reconhecido ou não pela RNA polimerase de *E. coli*. De um modo geral, esses estudos contribuem para a confirmação dos nossos resultados.

M. smegmatis e *M. bovis* BCG eletrocompetentes foram transformadas com os vetores de expressão pLA71- P_{Σ} e os transformantes selecionados, inicialmente, pela observação de micobactérias fluorescentes em microscópio de fluorescência para diferencia-las daquelas que embora possuíam o

plasmídeo não apresentavam expressão. Felizmente, observamos fluorescência para quase todas as construções, exceto pLA71- $P_{\alpha Ag}$ -*gfp*. Os vetores de expressão usados mostraram níveis de expressão diferentes dependentes das micobactérias transformadas. Medeiros et al. (2002) construíram vetores de expressão para estudar diferentes promotores micobacterianos através da atividade da β -galactosidase e também observaram esse tipo de fenômeno ao usar *M. smegmatis*, *M. vaccae* e *M. bovis* BCG.

Em nosso estudo, o promotor P_{AN} apresentou valores semelhantes de expressão em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG; o promotor P_{BlaF^*} teve maior atividade no *M. smegmatis* do que no *M. bovis* BCG; diferente do promotor P_{hsp60} que apresentou maior atividade no *M. bovis* BCG do que no *M. smegmatis*. Embora, nosso vetor seja o mesmo para todas as construções, o que em tese evitaria a influência do número de cópias sobre os níveis de expressão de GFP registrada nas duas espécies de micobactérias, não realizamos nenhuma investigação para determinar se o número de cópias dos plasmídeos seria o mesmo entre essas duas espécies. Das Gupta et al. (1993) mostraram que promotores fortes ocorrem com menos frequência nas espécies patogênicas de crescimento lento do que nas espécies não patogênicas de crescimento rápido. Baseado nisso, podemos trabalhar com a hipótese de que a origem nativa do promotor contribui para sua força de expressão.

No caso do pLA71- P_{L5} -*gfp* não foi possível obter nenhum transformante, talvez, devido a uma toxicidade provocada pela superexpressão de GFP, fato ainda não relatado em outros estudos sobre o uso da proteína fluorescente. Em outra parte do nosso estudo, utilizamos um BCG recombinante expressando GFP sob o controle do P_{L5} (ROSA, 2009), onde o cassete encontra-se num vetor integrativo (rBCG pJH223- P_{L5} -*gfp*) e não observamos problemas semelhantes com sua superexpressão. Talvez o fato de ser integrativo contribua para uma maior estabilidade de expressão, o que não ocorre na nossa construção no vetor pLA71, um vetor extracromossomal. Por outro lado, o fato de ser integrativo também pode levar a uma expressão reduzida em relação ao vetor extracromossomal.

O uso de *gfp* como gene repórter foi extremamente útil para monitorizar a expressão de genes em micobactérias, incluindo a localização do organismo

no macrófago do hospedeiro, como já visto em outros estudos (COWLEY et al., 2001; KAVITA et al., 2008). Nos ensaios *in vitro*, podemos localizar os BCG recombinantes dentro dos macrófagos da linhagem RAW 264.7 através da microscopia confocal e da citometria de fluxo, além de avaliarmos alterações na expressão de GFP pelo BCG recombinante internalizado. Os mecanismos de regulação gênica utilizados pelas micobactérias ainda é um tema que precisa ser melhor compreendido e portanto, um campo aberto para pesquisa, principalmente quanto às estratégias de sobrevivência intracelular. Dellagostin et al. (1995) relataram que o promotor do gene 18 kDa é especificamente ativado durante o crescimento intracelular e, por conseguinte, pode estar envolvido na sobrevivência de *M. leprae* dentro de macrófagos. Fato semelhante ocorre com o promotor *mtrA*, de *M. tuberculosis*. Via et al. (1996) confirmaram que a atividade do promotor em BCG recombinante era induzida na infecção de macrófagos.

A partir dos clones de BCG recombinantes caracterizados por citometria de fluxo e os resultados do ensaio *in vitro*, partimos então para um possível monitoramento da localização do BCG depois de inoculado em camundongos. O método para determinar a presença do BCG após sua administração está limitado a detectar colônias em meio sólido após coleta dos órgãos, o que leva, aproximadamente, três semanas de incubação para o BCG. Usando BCG recombinantes expressando GFP, esse tempo poderia ser diminuído para o tempo da coleta dos órgãos, e da detecção de fluorescência por citometria de fluxo. Além disso, a detecção de um rBCG fluorescente, mesmo que seja pelo método tradicional, pode evitar um falso positivo pela contaminação com outro tipo de micobactéria.

Foi possível confirmar a presença de colônias de BCG (recombinante ou nativo) nos pulmões dos camundongos após 1 e 3 dias de inoculação por meio direto, em meio sólido. Adicionalmente, a presença de BCG recombinante também foi confirmada por microscopia de fluorescência e confocal. Por outro lado, as análises por citometria de fluxo para a determinação da presença de BCG no pulmão foi inconclusiva, tanto pela via subcutânea, quanto pela via intradérmica, devido a ocorrência de uma alta autofluorescência das células.

Alguns trabalhos comparam a recuperação de bacilos por diversas vias de inoculação utilizando um período de tempo maior, de semanas a meses.

Palendira et al. (2002) compararam a recuperação de BCG nativo após inoculação de camundongos fêmeas C57BL/6 pelas vias intravenosa, subcutânea e aerosol, com 10^3 UFC/animal, durante os pontos de 1-12 semanas. Em relação a via subcutânea, não foram observadas colônias em nenhum ponto analisado. Abadie et al. (2005) estudaram a rápida migração de neutrófilos pela via linfática, atuando como apresentadores de antígenos após inoculação de camundongos fêmeas C57BL/6 pela via intradérmica com 10^6 UFC/animal. Foi utilizado um BCG recombinante expressando GFP e avaliaram recuperação de UFC na pele da orelha e no linfonodo drenante mais próximo dos camundongos, sem relatos de análise no pulmão. Estudos mais recentes, realizados por Vogelzang et al. (2014), mostraram que seu BCG recombinante tem uma persistência diminuída em camundongos C57BL/6 após a imunização subcutânea ($0,5-1 \times 10^6$ UFC/animal) e que isso prejudicaria sua migração aos pulmões, ao contrario do BCG nativo, que eles conseguem recuperar no pulmão em três períodos diferentes ao longo de um mês. Baseado nesse relato, podemos sugerir que a nossa construção seja mais estável e apropriada para uma vacina baseada em BCG recombinante.

Os resultados obtidos com as novas construções mostraram-se interessantes, pois abrem a perspectiva de utilizarmos essas construções para testarmos vários antígenos heterólogos sendo expressos num mesmo plasmídeo, mas a níveis de expressão variáveis, portanto, permitindo uma melhor caracterização do efeito da expressão.

Por outro lado, a investigação de outros elementos, além da força dos promotores, também é importante, como o uso de vetores integrativos, induzíveis *in vivo* e de sequencias sinais de exportação (DENNEHY, WILLIAMSON, 2005). Há estudos mostrando que cepas de BCG recombinante com vetores extracromossomais perdem rapidamente seus plasmídeos *in vivo* (MEDERLE et al., 2002) e um vetor integrativo possibilitaria a construção de cepas recombinantes mais estáveis (ABDELHAK et al., 1995).

O presente estudo contribuiu para a obtenção de vetores de expressão micobacterianos com promotores com força de expressão variáveis em um mesmo esqueleto plasmidial estável para serem utilizados numa possível vacina baseada em BCG recombinante como veículo vivo para apresentação de antígenos heterólogos.

REFERÊNCIAS*

ABADIE, V.; BADELL, E.; DOUILLARD, P.; ENSERGUEIX, D.; LEENEN, P. J. M.; TANGUY, M.; FIETTE, L.; SAELAND, S.; GICQUEL, B.; WINTER, N.; Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1843-1850, 2005.

ABDELHAK, S.; LOUZIR, H.; TIMM, J.; BLEL, L.; BENLASFAR, Z.; LAGRANDERIE, M.; GHEORGHIU, M.; DELLAGI, K.; GICQUEL, B.; Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. **Microbiology**, v. 141, p. 1585-1592, 1995.

ALDOVINI, A.; YOUNG, R. A.; Humoral and Cell-Mediated Immune- Responses to Live Recombinant BCG-HIV Vaccines. **Nature**, v. 351, p. 479-482, 1991.

BARLETTA, R. G.; KIM, D. D.; SNAPPER, S. B.; BLOOM, B. R.; JACOBS, W. R.; Identification of expression signals of the mycobacteriophages Bxb1, L1 and TM4 using the *Escherichia-Mycobacterium* shuttle plasmid pYUB75 and pYUB76 designed to create translational fusions to the *lacZ* gene. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 23-30, 1992.

BASTOS, R. G.; BORSUK, S.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6495–6503, 2009.

BASHYAM, M. D.; KAUSHAL, D.; DASGUPTA, S. K.; TYAGI, A. K.; A Study of the Mycobacterial Transcriptional Apparatus: Identification of Novel Features in Promoter Elements. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 16, p. 4847–4853, 1996.

BORSUK, S.; MENDUMB, T. A.; FAGUNDESA, M. Q.; MICHELONA, M.; CUNHA, C. W.; MACFADDEN, J.; DELLAGOSTIN, O. A.; Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG. **Tuberculosis**, v. 87, p. 474-480, 2007.

BRITTON, W. J.; PALENDIRA, U.; Improving vaccines against tuberculosis. **Immunology and Cell Biology**, v. 81, p. 34-45, 2003.

BLOOM, B. R.; JACOBS, W. R.; New Strategies for Leprosy and Tuberculosis and for Development of Bacillus Calmette-Guérin into a Multivaccine Vehicle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 569, p. 155–173, 1989.

CALMETTE, A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. **Proceedings of the Royal Society Medicine**, v. 24, n. 11, p. 1481-1490, 1931.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CASART, Y.; GAMERO, E.; RIVERA-GUTIERREZ, S.; GONZÁLEZ-Y-MERCHAND, J.; SALAZAR, L.; Par genes in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium smegmatis* are arranged in an operon transcribed from “SigGC” promoters. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 1-13, 2008.

CAYABYAB, M. J.; HOVAV, A.; HSU, T.; KRIVULKA, G. R.; LIFTON, M. A.; GORGONEL, D. A.; FENNELLY, G. J.; HAYNES, B. F.; JACOBS, W. R.; LETVIN, N. L.; Generation of CD8⁺ T-cell responses by a recombinant nonpathogenic *Mycobacterium smegmatis* vaccine vector expressing human immunodeficiency virus type I Env. **Journal of Virology**, v. 80, p. 1645-1652, 2006.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C.; Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.

COLDITZ, G. A.; BREWER, T. F.; BERKEY, C. S.; Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. **Journal of the American Medical Association**, v. 271, n. 9, p. 698–702, 1994.

COWLEY, S. C.; AV-GAY, Y. Monitoring promoter activity and protein localization in *Mycobacterium spp.* using green fluorescent protein. **Gene**, v. 264, p. 225-231, 2001.

CURCIC, R.; DHANDAYUTHAPAM, S.; DERETIC, V.; Gene expression in mycobacteria: transcriptional fusions based on *xylE* and analysis of the promoter region of the response regulator *mtrA* from *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 1057-1064, 1994.

DA COSTA, A. C.; COSTA-JUNIOR, A. O.; OLIVEIRA, F. M.; NOGUEIRA, S. V.; ROSA, J. D.; RESENDE, D. P.; KIPNIS, A.; KIPNIS, A. P. J.; A New Recombinant BCG Vaccine Induces Specific Th17 and Th1 Effector Cells with Higher Protective Efficacy against Tuberculosis. **Plos One**, v. 9, ed. 11, p. 1-14, 2014.

DAS GUPTA, S. K.; BASHYAM, M. D.; TYAGI, A. K.; Cloning and Assessment of Mycobacterial Promoters by Using a Plasmid Shuttle Vector. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 16, p. 5186-5192, 1993.

DELLAGOSTIN, O. A.; WALL, S.; NORMAN, E.; OSHAUGHNESSY, T.; DALE, J. W.; MCFADDEN, J.; Construction and Use of Integrative Vectors to Express Foreign Genes in Mycobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 10, p. 983-993, 1993.

DELLAGOSTIN, O. A.; ESPOSITO, G.; EALES, L. J.; DALE, J. W.; MCFADDEN, J.; Activity of mycobacterial promoters during intracellular and extracellular growth. **Microbiology**, v. 141, p. 1785-1792, 1995.

DENNEHY, M.; WILLIAMSON, A. L.; Factors influencing the immune response to foreign antigen expressed in recombinant BCG vaccines. **Vaccine**, v. 23, p. 1209–1224, 2005.

DHAR, N.; RAO, V.; TYAGI, A.K.; Recombinant BCG approach for development of vaccines: cloning and expression of immunodominant antigens of *M. tuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, p. 309-316, 2000.

DHAR, N.; RAO, V.; TYAGI, A.K.; Skewing of the Th1/Th2 responses in mice due to variation in the level of expression of an antigen in a recombinant BCG system. **Immunology Letters**, v. 88, p.175-184, 2003.

EISENSTADT, J.; HALL, G. S.; Microbiology and classification of mycobacteria. **Clinics in Dermatology**, v. 13, n. 3, p. 197-206, 1995

EREMEEV, V. V.; MAIORO, K. B.; AVDIENKO, V. G.; KONDRASHOV, S.; APT, A.; An experimental analysis of *Mycobacterium smegmatis* as a possible vector for the design of a new tuberculosis vaccine. **Problemy Tuberkuleza**, v. 1, p. 49-51, 1996.

GICQUEL, B.; BCG as a vector for the construction of multivalent recombinant vaccines. **Biologicals**, v. 23, n. 2, p. 113-118, 1995.

GORDON, S.; PARISH, T.; ROBERTS, I. S.; ANDREW, P. W.; The application of luciferase as reporter of environmental regulation of gene expression in micobactéria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 336-340, 1994.

HOFT, D. F.; BLAZEVIC, A.; ABATE, G.; HANEKOM, W. A.; KAPLAN, G.; SOLER, J. H.; WEICHOLD, F.; GEITER, L.; SADOFF, J. C.; HORWITZ, M. A.; A new recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 10, p. 1491-501, 2008.

JACOBS, W. R.; TUCKMAN, M.; BLOOM, B. R.; Introduction of Foreign DNA Into Mycobacteria Using A Shuttle Phasmid. **Nature**, v. 327, p. 532-535, 1987.

JACOBS, W. R. J.; BARLETTA, R. G.; UDAM, R.; CHAN, J.; KALKUT, G.; SOSONE, G.; KIESER, T.; SARKINS, G. J.; HATFUL, G. F.; BLOOM, B. R.; Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. **Science**, v. 260, p. 819-822, 1993.

KAVITA, P.; BURMA, P. K.; A comparative analysis of green fluorescent protein and β -glucuronidase protein-encoding genes as a reporter system for studying the temporal expression profiles of promoters. **Journal of Biosciences**, v. 33, p. 337-343, 2008.

KENDALL, J. M.; BADMINTON, M. N.; *Aequorea Victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 216-224, 1998.

KREMER, L.; BAULARD, A.; ESTAQUIER, J.; POULAIN-GODEFROY, O.; LOCHT, C.; Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 17, p. 913-922, 1995.

LAGRANDERIE, M.; WINTER, N.; BALAZUC, A. M.; GICQUEL, B.; GHEORGHIU, M.; A cocktail of *Mycobacterium bovis* BCG recombinants expressing the SIV Nef, Env, and Gag antigens induces antibody and cytotoxic responses in mice vaccinated by different mucosal routes. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 14, n. 18, p. 1625-33, 1998.

LEHMANN, K. B.; NEUMANN, R. O.; **Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik**, München : J. F. Lehmann, 1896. 208 p.

LIM, E. M.; RAUZIER, J.; TIMM, J.; TORREA, G.; MURRAY, A.; GICQUEL, B.; PORTNOI, D.; Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Sequences Encoding Exported Proteins by Using *phoA* Gene Fusions. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 1, p. 59–65, 1995.

LÜ, L.; CAO, H. D.; ZENG, H. Q.; WANG, P. L.; WANG, L. J.; LIU, S. N.; XIANG, T. X.; Recombinant *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 vaccine expressing outer membrane protein 26 kDa antigen affords therapeutic protection against *Helicobacter pylori* infection. **Vaccine**, v. 27, p. 972-978, 2009.

MATSUO, K.; YAMAGUCHI, R.; YAMAZAKI, A.; TASAKA, H.; TERASAKA, K.; TOTSUKA, M.; KOBAYASHI, K.; YUKITAKE, H.; YAMADA, T.; Establishment of A Foreign Antigen Secretion System in Mycobacteria. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 4049-4054, 1990.

MATSUO, K.; YASUTOMI, Y.; Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guérin as a Vaccine Vector for Global Infectious Disease Control. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2011, 9 p., 2011.

MEDEIROS, M. A.; DELLAGOSTIN, O. A.; ARMOA, G. R. G.; DEGRAVE, W. M.; LIMA, L. M.; LOPES, M. Q.; COSTA, J. F.; MCFADDEN, J.; McINTOSH, D.; Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. **Microbiology**, v. 148, p. 1999–2009, 2002.

MEDERLE, I.; BOURGUIN, I.; ENSERGUEIX, D.; BADELL, E.; MONIZ-PEIREIRA, J.; GICQUEL, B.; WINTER, N.; Plasmidic versus insertional cloning of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: Impact on in vivo antigen persistence and immune responses. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 303-314, 2002.

MISTELI, T.; SPECTOR, D. L.; Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 961-964, 1997.

MURRAY, A.; WINTER, N.; LAGRANDERIE, M.; HILL, D. F.; RAUZIER, J.; TIMM, J.; LECLERC, C.; MORIARTY, K. M.; GHEORGHIU, M.; GICQUEL, B.; Expression of *Escherichia coli* Beta-Galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG Using An Expression System Isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* Which Induced Humoral and Cellular Immune-Responses. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 3331-3342, 1992.

NASCIMENTO, I. P.; DIAS, W. O.; MAZZANTINI, R. P.; MIYAJI, E. N.; GAMBERINI, M.; QUINTILIO, W.; GEBARA, V. C.; CARDOSO, D. F.; HO, P. L.; RAW, I.; WINTER, N.; GICQUEL, B.; RAPPUOLI, R.; LEITE, L. C. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 4877-4883, 2000.

NASCIMENTO, I. P.; DIAS, W. O.; QUINTILIO, W.; HSU, T.; JACOBS, W. R.; LEITE, L. C. C.; Construction of an unmarked recombinant BCG expressing a pertussis antigen by auxotrophic complementation: Protection against *Bordetella pertussis* challenge in neonates. **Vaccine**, v. 27, p. 7346–7351, 2009.

NESBIT, C. E.; LEVIN, M. E.; DONNELLY, M. K.; HATFULL, G. F.; Transcriptional regulation of repressor synthesis in mycobacteriophage L5, **Molecular Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 1045-1056, 1995.

NOLTE, F. S.; METCHOCK, B.; Mycobacterium. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H.; Manual of clinical microbiology. **American Society for Microbiology**, v. 6, p. 400-37, 1995.

PALENDIRA, U.; BEAN, A. G. D.; FENG, C. G.; BRITTON, W. J.; Lymphocyte Recruitment and Protective Efficacy against Pulmonary Mycobacterial Infection Are Independent of the Route of Prior *Mycobacterium bovis* BCG Immunization. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 3, p. 1410–1416, 2002.

PARISH, T.; STOKER, N. G.; Methods in molecular biology. Mycobacterial Protocols. Humana Press, v. 101, p 1-472, 1998.

PRASHER, D. C.; ECKENRODE, V. K.; WARD, W. W.; Primary structure of the *Aequore victotia* green-fluorescent protein. **Gene**, v. 111, p. 229-233, 1992.

ROSA, C. G.; **Avaliação da atividade de promotores em micobactérias recombinantes utilizando gfp como gene repórter: Implicações na expressão de antígenos contra a leishmaniose**. 2009. 48 f. (Monografia em Ciências Biológicas) Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2009.

SHIMOMURA, O.; The discovery of aequorin and green fluorescent protein. **Journal Microscopy**, v. 217, p. 1-2, 2005.

SNAPPER, S. B.; LUGOSI, L.; JEKKEL, A.; MELTON, R. E.; KIESER, T.; BLOOM, B. R.; JACOBS, W. R.; Lysogeny and Transformation in Mycobacteria

– Stable Expression of Foreign Genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 6987-6991, 1988.

SNAPPER, S. B.; MELTON, R. E.; MUSTAFA, S.; KIESER, T.; JACOBS, W. R.; Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. **Molecular Microbiology**, v. 4, p. 1911-1919, 1990.

STOVER, C. K.; de la CRUZ, V.; FUERST, T. R.; BURLEIN, J. E.; BENSON, L. A.; BENNETT, L. T.; BANSAL, G. P.; YOUNG, J. F.; LEE, M. H.; HATFULL, G. F.; New use of BCG for recombinant vaccines. **Nature**, v. 351, p. 456-460, 1991.

STOVER, C. K.; BANSAL, G. P.; HANSAN, M. S.; BURLEIN, J. E.; PALASZYNSKI, S. R.; YOUNG, J. F.; KOENING, S.; YOUNG, D. B.; SADZIENE, A.; BARBOUR, A. G.; Protective immunity elicited by recombinant Bacille Calmette-Guérin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 197-209, 1993.

TIMM, J.; PEROLLI, M. G.; DUEZ, C.; TRIAS, J.; OREFICI, G.; FATTORINI, L.; AMICOSANTE, G.; ORATORE, A.; JORIS, B.; FRERE, J. M.; PUSGLEY, A. P.; GICQUEL, B.; Transcription and expression analysis, using lacZ and phoA gene fusions, of *Mycobacterium fortuitum* beta-lactamase genes cloned from a natural isolate and a high-level beta-lactamase producer. **Molecular Microbiology**, v. 12, p. 491-50, 1994a.

TIMM, J.; LIM, E. M.; GICQUEL, B.; *Escherichia coli-mycobacteria* shuttle vectors for operon and gene fusions to lacZ: the pJEM series. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 6749-6753, 1994b.

VARALDO, P. B.; LEITE, L. C.; DIAS, W. O.; MIYAJI, E. N.; TORRES, F. I.; GEBARA, V. C.; ARMOA, G. R.; CAMPOS, A. S.; MATOS, D. C.; WINTER, N.; GICQUEL, B.; VILAR, M. M.; MCFADDEN, J.; ALMEIDA, M. S.; TENDLER, M.; MCINTOSH, D. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. **Infection Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3336-3343, 2004.

VENKATASWAMY, M. M.; NG, T. W.; KHARKWAL, S. S.; CARRENO, L. J.; JOHNSON, A. J.; VELAYUDHAN, S. K.; LIU, Z.; BITTMAN, R.; JERVIS, P. J.; COX, L. R.; BESRA, G. S.; WEN, X.; YUAN, W.; TSUJI, M.; LI, X.; HO, D. D.; CHAN, J.; LEE, S.; FROTHINGHAM, R.; HAYNES, B. F.; PANAS, M. W.; GILLARD, G. O.; SIXSMITH, J. D.; SCHMITZ, B. K.; SCHMITZ, J. E.; LARSEN, M. H.; JACOBS, W. R.; PORCELLI, S. A.; Improving *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin as a Vaccine Delivery Vector for Viral Antigens by Incorporation of Glycolipid Activators of NKT Cells. **PLoS ONE**, v. 9, ed. 9, p. 1-11, 2014.

VOGELZANG, A.; PERDOMO, C.; ZEDLER, U.; KUHLMANN, S.; HURWITZ, R.; GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. E.; Central Memory CD4+ T Cells Are Responsible for the Recombinant Bacillus Calmette-Guérin ΔureC::hly

Vaccine's Superior Protection Against Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, p. 1928–37, 2014.

VIA L. E.; CURCIC, R.; MUDD, M. H.; DHANDAYUTHAPANI, S.; ULMER, R. J.; DERETIC, V.; Elements of signal transduction in *Mycobacterium tuberculosis*: in vitro phosphorylation and in vivo expression of the response regulator MtrA. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 11, p. 3314-3321, 1996.

VIA, L. E.; DHANDAYUTHAPANI, S.; DERETIC, D.; DERETIC, V.; Green Fluorescent Protein: A Tool for Gene Expression and Cell Biology in Mycobacteria. **Methods in Molecular Biology**, v. 101, p. 245-260, 1998.

WARD, W. W.; Biochemical and Physical Properties of Green Fluorescent Protein. In: CHALFIE, M., KAIN, S., eds. **Green Fluorescent Protein: properties, applications and protocols**. New York: Wiley-Liss, 1998, p. 45-75.

WINTER, N.; LAGRANDERIE, M.; RAUZIER, J.; TIMM, C.; LECLERC, B.; GUY, M. P.; KIENY, M.; GHEORGHIU, M.; GICQUEL, B.; Expression of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein. **Gene**, v. 109, p. 47-54, 1991.

YU, J.; HAMARI, Z.; HAN, K.; SEO, J.; REYES-DOMINGUEZ, Y.; SCAZZACCHIO, C.; Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 973–981, 2004.