UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Análises Clínicas

**Desenvolvimento de micobacteriófago recombinante para detecção
rápida de bacilos da tuberculose**

Joás Lucas da Silva

Tese para obtenção do grau de:
DOUTOR

Orientador:

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo, 2011

Desenvolvimento de micobacteriófago recombinante para detecção rápida de bacilos da tuberculose.

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata

Orientador/Presidente

Prof. Dr.
1ª. Examinador(a)

Prof. Dr.
2ª. Examinador(a)

Prof. Dr.
3ª. Examinador(a)

Prof. Dr.
4ª. Examinador(a)

São Paulo, 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Manoel Lucas da Silva e Maria José da Silva, que lutaram bravamente pela educação de todos os filhos, prestando apoio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida. A minha esposa, Fábiana de Oliveira Andrade, pelo amor, compreensão e união, que foram fundamentais na realização deste sonho. Aos meus irmãos, pelo incentivo na busca de meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo e guiar o meu caminho.

Ao meu orientador, Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata, pela orientação deste trabalho e ao singular estímulo ao livre pensamento científico.

À Prof. Tit. Rosário Dominguez Crespo Hirata, pela paciência, críticas e sugestões no desenvolvimento deste e de outros projetos.

Ao prof. Graham F. Hatfull pela grande oportunidade em desenvolver parte fundamental dos experimentos em seu laboratório sob a sua orientação e pelas valiosas informações sobre clonagem e recombinação em micobactérias e fagos.

À Prof. Mariana Piuri, pelo estimado apoio e valiosos ensinamentos prestados durante a minha passagem pela Universidade de Pittsburgh.

À Cristina Moreno Fajardo, técnica do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF/USP, pela amizade, ensinamentos, e apoio técnico fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Prof. Elsa Masae Mamizuka e Jorge Luiz Mello Sampaio pelas sugestões nas inúmeras tentativas efetuadas para superar os obstáculos que surgiram ao longo deste projeto.

Aos meus pais, Manoel Lucas da Silva (*in memoriam*) e Maria José da Silva, e aos meus irmãos Maria do Carmo Silva Pereira, Carmen Lúcia Silva, Rinaldo Lucas da Silva e João Roberto da Silva por todo apoio e compreensão prestados durante todo este trabalho.

A minha maravilhosa esposa, Fábiana de Oliveira Andrade, por sempre estar ao meu lado e incentivar a busca pela realização de nossos sonhos.

Aos colegas do laboratório, especialmente Gisele de Medeiros Bastos, Walkíria de Araújo Souza, e Gabriela Guimarães Sousa Leite, pelo apoio científico e grande amizade.

A todos que compõem a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e o Departamento de Análises Clínicas e toxicológicas pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos financeiros disponibilizados para este projeto sob o n. 2008/05076-7 e pela bolsa de doutorado concedida sob o n. 2008/05082-7.

RESUMO

SILVA, J.L. **Desenvolvimento de micobacteriófago recombinante para detecção rápida de bacilos da tuberculose.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O diagnóstico da tuberculose por métodos tradicionais é lento e laborioso. Por outro lado, os testes moleculares são rápidos, mas com custo elevado para países em desenvolvimento. Este projeto teve o objetivo de inserir no micobacteriófago D29 o gene que codifica a proteína verde fluorescente (eGFP) e estudar o fago recombinante na detecção rápida de bacilos da tuberculose. Para tanto, foi inserido o cassete *Hsp60-eGFP* no genoma do fago D29 por recombinação. Micobacteriófagos recombinantes purificados foram utilizados para infectar *M. smegmatis* mc² 155 e *M. tuberculosis* H37Rv durante um período de 1- 6h nas temperaturas de 30°C, 37°C e 42°C. Bactérias fluorescentes foram observadas em um período de 2h, mas em número reduzido, indicando que o micobacteriófago lisou às células rapidamente, dificultando a expressão da eGFP e visualização em microscópio de fluorescência. A deleção do gene *LysA*, foi efetuada a fim de aumentar o período de latência do fago. Não foi possível a purificação de fagos recombinantes, devido à baixa quantidade de recombinantes nos halos de inibição. Será necessário a redução da atividade o gene *LysA* e, provavelmente, de outros genes associados a lise celular a fim de aumentar a concentração de eGFP no interior da célula.

Palavras-chave: micobacteriófagos, recombinação, tuberculose.

ABSTRACT

SILVA, J.L. **Development of recombinant micobacteriophage for rapid detection of tubercle bacillus.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

Classical biochemical methods for *Mycobacterium tuberculosis* identification are lengthy and time-consuming. On the other hand, molecular assays are rapid but expensive for developing countries. This project aimed to insert into the mycobacteriophage D29, the gene coding for the green fluorescent protein (eGFP) and use the recombineered phage to detect *Mycobacterium tuberculosis* rapidly and less costly. For that, the *Hsp-eGFP* cassette was inserted into D29 genome. Recombineered mycobacteriophages was purified and used to infect *M. smegmatis* mc² 155 and *M. tuberculosis* H37Rv from 1-6 hs at 30°C, 37°C and 42°C. Observation of fluorescent bacteria was difficult and only a small number of them were seen at 2 hs of infection. This indicated that recombineered bacteriophages were lysing cells rapidly. Deletion of *LysA* gene, was carried out to increase the time needed for bacterial lysing. it was not possible to purify mutant mycobacteriophages due to the low concentration of recombinant phages. We conclude that might be necessary the deletion of other genes such as *LysB*, a gene also involved in cell lysis and reduction *LysA* activity to increase the concentration of *eGFP* inside cells.

Key words: mycobacteriophages, recombineering, tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Recombinação por crossover simples e duplo em micobactérias.....	20
Figura 2.	Recombinação com plasmídeos e marcadores de contra-seleção.....	21
Figura 3.	Produção de fagemídeos para inserção, deleção e expressão de genes em micobactérias.....	24
Figura 4.	Produção de bactérias recombinantes a partir de fagemídeos.....	25
Figura 5.	Produção do inserto para recombinação homóloga.....	27
Figura 6.	Deteção e purificação de fagos recombinantes.....	28
Figura 7.	Quantificação de bacteriófagos pelo método tradicional.....	32
Figura 8.	Produção de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155:pJV53 eletrocompetentes para recombinação.....	38
Figura 9.	Halos de inibição formados após eletroporação de DNA de D29 e o inserto de 200 pb em células de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155:pJV53.....	49
Figura 10.	Produto da PCR dos halos de inibição formados após infecção de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.....	50
Figura 11.	Produto da PCR dos halos de inibição de fagos purificados.....	50
Figura 12.	Produto da PCR resultantes da amplificação do cassete <i>Hsp-GFP</i> e <i>eGFP</i>	51
Figura 13.	Eletroforese em gel de agarose da PCR dos halos de inibição primários. Identificação de fagos mutantes contendo o gene da <i>eGFP</i>	52
Figura 14.	Eletroforese da PCR dos halos de inibição primários.....	53
Figura 15.	PCR dos halos de inibição após sucessivas diluições e plaqueamento..	54

Figura 16. Expressão da eGFP em micobactérias infectadas com micobacteriófago recombinante.....	56
Figura 17. PCR dos halos de inibição para detecção de fago deficiente do gene LysA.....	57
Figura 18. Ensaio fenotípico para detecção de fagos mutantes para o gene LysA.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Critérios de interpretação e leitura dos dados da baciloscopia, concentrada ou não, corada pelo Ziehl-Neelsen.....	3
Tabela 2.	Primers e fragmento de 100pb utilizados na amplificação do inserto deleção.....	41
Tabela 3.	Iniciadores utilizados para amplificação do cassete <i>Hsp60-GFP</i> e <i>GFP</i> com homologia de 100pb ao DNA do D29 em ambos os lados.....	43
Tabela 4.	Iniciadores utilizados para deleção do gene <i>LysA</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADC	Albumina, Dextrose, Catalase
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
¹⁴ C	Carbono 14
CO ₂	Dióxido de carbono
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
D.O	Densidade ótica
DOT	Tratamento diretamente observado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
eGFP	Proteína Verde Fluorescente
GI	Índice de crescimento
g	grama
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HCl	Ácido clorídrico
h	hora
INH	Isoniazida
Kb	kilobases
LJ	Lowenstein jensen
LRP	Fagos que expressam luceferase
LB	Luria Bertani
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
Min	minuto
ml	mililitros
mM	milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MNT	micobactérias não tuberculosas
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ng	nanograma
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
nM	nanomolar
ORF	Sequencia aberta de leitura
OADC	Ácido oléico, Albumina, Dextrose, Catalase
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
pb	pares de bases
REMA	Ensaio em microplaca com rezasurina
RIF	Rifampicina
RPM	rotação por minuto
STR	Streptomicina
tRNA	RNA transportador
U	Unidade
v	volume
μl	microlitro

SUMÁRIO

1. introdução.....	1
1.1 Diagnóstico Laboratorial da Tuberculose.....	2
1.1.1 Baciloscopia.....	2
1.1.2 Cultura.....	4
1.1.3 Métodos moleculares.....	6
1.2. Bacteriófagos.....	9
1.2.1 Aplicações dos bacteriófagos.....	10
a) <i>Terapia fágica.....</i>	<i>10</i>
b) <i>Identificação bacteriana e perfil de resistência aos fármacos.....</i>	<i>13</i>
c) <i>Controle da flora bacteriana normal.....</i>	<i>16</i>
1.3. Introdução de genes em micobactérias.....	17
1.3.1 <i>Recombinação clássica em micobactérias.....</i>	<i>17</i>
1.3.2 <i>Produção de fagemídeos.....</i>	<i>21</i>
1.3.3 <i>Recombinação alélica.....</i>	<i>25</i>
1.4 Micobacteriófago D29.....	29
2. Objetivos.....	29
3. Material e métodos.....	30
3.1. Produção de Escherichia coli DH5α competentes.....	30
3.2. Plasmídeos.....	30
3.3. Produção de estoque de micobacteriófagos.....	31
3.4. Quantificação do micobacteriófago pelo método tradicional.....	31

3.5. Quantificação de micobacteriófago pela reação da polimerase em cadeia em tempo real.....	33
3.5.1. Amplificação de um fragmento de DNA do fago D29.....	33
3.5.2. Clonagem e identificação de plasmídeos.....	34
3.5.3 Construção da curva padrão.....	35
3.5.4. Quantificação de fagos pela qPCR em tempo real.....	35
3.6. Extração do DNA de bacteriófago.....	36
3.8. Inserção do Hsp60-GFP e eGFP no bacteriófago D29 por recombinação em micobacteriófagos por eletroporação de DNA.....	37
3.8.1Produção de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155:pJV53 eletrocompetentes.....	37
3.8.2. Identificação e deleção de regiões do genoma do D29.....	38
3.8.3 Eletroporação do D29 e do fragmento de 200pb em células de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155:pJV53.....	39
3.8.4. Detecção de micobacteriófagos recombinantes.....	40
3.8.5. Obtenção de bacteriófagos mutantes puros.....	41
3.8.6 Eletroporação do DNA do D29 e do inserto contendo o <i>Hsp60-eGFP</i> ou o <i>eGFP</i> em células de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155::pJV53.....	42
3.9. Deleção do gene LysA do fago D29	44
3.9.1. Identificação de recombinantes.....	44
a) Pela PCR.....	44
b) Seleção fenotípica.....	45
4.0 Avaliação da expressão da eGFP.....	46
5.0 Resultado e discussão.....	47

5.1. Análise do genoma do D29 para inserção da <i>eGFP</i> e <i>Hsp60-eGFP</i>	47
5.2. Deleção do gene 71 e 72 do D29.....	48
5.3. Amplificação, eletroporação dos insertos <i>Hsp-eGFP</i> , <i>eGFP</i> e purificação de fagos mutantes.....	50
5.4. Expressão da <i>eGFP</i>	53
5.5 Deleção do gene <i>LysA</i>	55
6. Conclusões	58
7. Referências	59
8. Anexos	67

1. Introdução

O desenvolvimento de métodos rápidos de identificação de *M. tuberculosis* e a detecção de resistência aos fármacos são essenciais para o combate a tuberculose. Novos métodos, além de rápidos, precisam ter um custo reduzido a fim de serem aplicados em todas as regiões com incidência da tuberculose (Neonakis et al., 2008).

Estima-se que um terço da população mundial hospeda o *Mycobacterium tuberculosis* na forma latente e mais de 50% dos profissionais de saúde de países em desenvolvimento apresentam a bactéria na forma latente (Joshi et al., 2007).

Com o objetivo de aumentar o controle sobre a tuberculose, a Organização Mundial de Saúde estabeleceu em 1995 um sistema de observação direta dos pacientes em tratamento (DOT). Nessa estratégia, os indivíduos infectados devem comparecer diariamente a um posto de saúde e tomar a medicação sob supervisão médica por um prazo de seis meses. Pacientes que apresentam exame bacteriológico negativo ao final do tratamento são considerados curados (Cox et al., 2008). Com a adesão de vários países ao DOT, tem sido observado um maior controle da doença, inclusive em países com poucos recursos financeiros (Dphil et al., 2008; Ige e Akindele, 2011; Van den Boogaard et al., 2011).

Apesar de grandes avanços na pesquisa da tuberculose nas últimas décadas, o diagnóstico da doença ainda depende predominantemente da baciloscopia que tem de 60 a 70% de sensibilidade, juntamente com a identificação da micobactéria em cultura. Alia-se a esta dificuldade, o prolongado período de incubação necessário para verificação da sensibilidade as drogas correntemente utilizadas (Miyata et al., 2011) e o

abandono do tratamento por parte de alguns pacientes, o que contribui significativamente para o surgimento de resistência (Van Den Boogaard et al., 2011).

Neste trabalho, propomos o desenvolvimento de um micobacteriófago recombinante, expressando a *eGFP*, para detecção de micobactérias em escarro. O micobacteriófago recombinante pode ser útil no desenvolvimento de técnicas rápidas na detecção de resistência aos fármacos antimicobacterianos bem como no diagnóstico laboratorial da tuberculose. Métodos semi-automatizados poderão ser desenvolvidos utilizando-se detectores de fluorescência. Além da praticidade, os resultados poderão ser disponibilizados em menos de 48 horas e com um custo inferior as técnicas de identificação que empregam a PCR.

1.1. Diagnóstico laboratorial da tuberculose

1.1.1. Baciloscopia

A baciloscopia é a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistente em esfregaço de amostra clínica corado com metodologia padronizada (MS, 2008).

A análise microscópica é o método indicado para a detecção do indivíduo bacilífero por ser simples e de baixo custo embora não permita a identificação da espécie micobacteriana. Este método é amplamente utilizado na rede pública para diagnóstico presuntivo e controle da eficácia do tratamento através da redução do número de bacilos no escarro (Cattamanchi et al., 2009). Apesar de algumas vantagens, a análise microscópica de esfregaços é laboriosa e monótona podendo induzir ao erro. O método também apresenta sensibilidade de apenas 25-65%, quando comparado com a cultura, e um limite de detecção entre 5000 e 10.000 bacilos/ml

(Mfinanga et al., 2007). Entretanto, a sensibilidade do método aumenta significativamente com a coleta de mais de uma amostra para exame em dias diferentes. A tabela 1 apresenta os critérios de leitura e interpretação dos dados da baciloscopia corada pelo método de Ziehl-Neelsen de acordo com o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (2008).

Tab. 1. Critérios de interpretação e leitura dos dados da baciloscopia, concentrada ou não, corada pelo Ziehl-Neelsen (Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, 2008).

Quando:
• não são encontrados BAAR em 100 campos = relata-se o resultado como NEGATIVO;
• são encontrados de 1 a 9 BAAR em 100 campos = relata-se apenas a quantidade de BAAR encontrada;
• são encontrados de 10 a 99 BAAR, em 100 campos = relata-se resultado como positivo +
• é encontrada em média de 1 a 10 BAAR por campo, nos primeiros 50 campos observados = relata-se resultado como positivo ++
• é encontrada em média 10 BAAR por campo, nos primeiros 20 campos observados = relata-se resultado como positivo +++

A fim de aumentar a sensibilidade da baciloscopia, o processamento das amostras (Subramanyam et al., 2010) e a microscopia tem sido constantemente

estudados. De acordo com Cattamanchi et al. (2009), a sensibilidade da baciloscopia não aumenta significativamente quando o material analisado é previamente concentrado. De acordo com Steingart et al., (2006) a microscopia de fluorescência, padrão em países desenvolvidos, tem maior sensibilidade do que a microscopia convencional na detecção de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR).

Bonnet et al., (2008) avaliaram a baciloscopia de escarro previamente tratado com hipoclorito a 3,5% e sedimentado por 24h em uma região de alta prevalência de indivíduos infectados por HIV. Três amostras de escarro, de dias consecutivos, foram recolhidas de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar. As amostras tratadas e não tratadas foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen. Um total de 1879 amostras foi analisado. Das amostras tratadas, 363 (19,3%) e 460 (24,5%) foram positivas, enquanto que 301 (16%) e 374 (19,9%) foram positivas na baciloscopia direta do escarro utilizando-se como ponto de corte 10 BAAR/100 campos ou 1 BAAR/100 campos, respectivamente. Estes dados demonstram que o tratamento com hipoclorito a 3,5% e a sedimentação por 24h aumenta a quantidade de bacilos na amostra e facilita a visualização de micobactérias.

1.1.2 Cultura

A cultura apresenta alta sensibilidade e especificidade na identificação de micobactérias com um limite de detecção de 100 BAAR/ml (MS, 2008). Permite o isolamento do microrganismo para posterior identificação da espécie, ensaios moleculares e posterior análise do perfil de resistência micobacteriana as drogas. Apesar da alta especificidade, a cultura de BAAR é lenta (Zeka et al., 2011) e não

permite a imediata identificação da espécie e perfil de resistência as drogas, dificultando a qualidade do tratamento da doença.

A cultura é utilizada principalmente no diagnóstico da TB de pacientes com baciloscopia repetidamente negativa e com sintomas clínicos da doença, indivíduos com tratamento prévio, pacientes imunodeprimidos, pessoas em contato com doentes resistentes ao tratamento, e em casos de suspeita de infecção por micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT). A cultura também é indicada no controle de pacientes com baciloscopia positiva ao final do segundo mês de tratamento, de indivíduos com indicação de retratamento e em estudos epidemiológicos (MS, 2008).

A partir dos anos 1980 a cultura de micobactérias foi aperfeiçoada com o intuito de reduzir o tempo necessário para a obtenção dos resultados. O BACTEC 460 foi o primeiro equipamento semi automatizado para detecção de micobactérias em meio líquido. Este sistema detecta indiretamente a presença de microrganismos a partir do metabolismo de ácido palmítico marcado com ^{14}C . A liberação do carbono marcado é quantificada e os resultados emitidos como índice de crescimento (GI). A supressão de microrganismos pertencentes a flora bacteriana normal que sobreviveram ao processo de descontaminação é feita com a adição de polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim e azlocilina. A identificação de cepas do complexo MTB pode ser efetuada com a adição de p-nitro-alfa-acetilamino-beta-hidroxipropiofenona (Rodrigues et al., 2007).

O BACTEC MGIT 960TB, não é radiométrico e utiliza a sensibilidade de sais de rutênio à concentração de O_2 no tubo. À medida que o oxigênio é consumido pelas

bactérias, o rutênio emite luminescência, que é detectada e convertida em sinais positivos pelo equipamento.

Outro sistema de detecção não radiométrico, o MB/BacT, aprovado para o uso diagnóstico nos Estados Unidos em 1996, baseia-se na detecção colorimétrica contínua de CO₂ para detectar o crescimento de micobactérias (Lucke et al., 2011).

O MB/BacT, BACTEC 460 e BACTEC 960TB detectam o crescimento bacteriano mais rápido que os métodos de cultivo clássicos em meio sólido. O tempo necessário para detecção de culturas positivas é bastante variável (9 a 15 dias) e dependente do número, tipo e qualidade das amostras, concentração de micobactérias, tratamento do paciente e processo de descontaminação das amostras. A utilização de métodos automatizados em combinação com o cultivo em meio sólido aumenta a sensibilidade da cultura em 4% e 6% para o BACTEC 960MGIT e BACTEC 460, respectivamente (Cruciane et al., 2004; Lucke et al., 2011).

Apesar de ser considerada uma técnica lenta, quando comparada com métodos moleculares, a cultura é referência no diagnóstico da tuberculose devido à sensibilidade e obtenção do microrganismo para condução de experimentos de identificação, estudos epidemiológicos e detecção de resistência por métodos fenotípicos e genotípicos (Cruciani et al., 2004; Rodrigues et al., 2007).

1.1.3. Métodos moleculares

O rápido diagnóstico da tuberculose e perfil de resistência aos fármacos é fundamental para o tratamento adequado, diminuição de pacientes bacilíferos, bloqueio

de transmissão do microrganismo e, conseqüentemente, redução do reservatório da doença.

Os métodos clássicos de identificação do microrganismo, desde o cultivo até a conclusão de ensaios bioquímicos e de testes de resistência aos fármacos são lentos e dificultam o controle da doença. Portanto, diversos ensaios moleculares tem sido empregados na identificação de micobactérias em amostras clínicas a partir da amplificação de sequências específicas de DNA (Telenti et al., 1993). A sensibilidade e especificidade dos ensaios moleculares são influenciadas pela presença de inibidores e do tipo de amostra utilizada.

Os genes *recA* (Neonakis et al., 2008), *dnAJ* (Yamada-Noda et al., 2007), *hsp65* (Poroca et al., 2009), *sodA* (Neonakis et al., 2008), além da região 16S-23S rRNA (Katoch et al., 2007) tem sido utilizados para detecção de *M. tuberculosis*. Entretanto, a sequencia de inserção IS6110 é a mais comum na identificação do complexo *M. tuberculosis* (Hsiao et al., 2010).

De acordo com Negi et al., (2007) a amplificação de IS6110 tem uma maior correlação com o diagnóstico clínico da tuberculose quando comparada com a detecção do mRNA, proteína 85B e com as sequencias que codificam para as proteínas 65kDa e 38kDa.

A PCR da sequência IS6110 é bastante utilizada por ser altamente específica e repetitiva no DNA micobacteriano, aumentando a sensibilidade do teste (Negi et al., 2007).

Kahla et al., (2011) analisaram 316 amostras pulmonares e extrapulmonares para detecção do complexo MTB pela amplificação de um fragmento de 580pb da

sequencia de inserção IS6110. As amostras foram processadas para baciloscopia, cultura em meio sólido e PCR. A PCR detectou 94,2% das amostras positivas na baciloscopia com um valor preditivo positivo de 100%. Segundo os autores, a PCR é importante no complemento de técnicas bacteriológicas convencionais, mas não pode substituí-las, pois a combinação da PCR com métodos tradicionais apresenta uma sensibilidade maior do que os testes individuais.

Após amplificação, o produto da PCR é submetido à análise eletroforética (IS6110), restrição enzimática (*Hsp65*), sequenciamento ou hibridização (16s rDNA). Esta última baseia-se na identificação e amplificação da sequência alvo, hibridização do DNA amplificado a sonda específica e detecção por colorimetria ou fluorescência (Negi et al., 2007).

A hibridização é comum em ensaios moleculares comercialmente disponíveis (Amplicor, INNO-LiPA Rif. TB, BD ProbeTec ET Direct TB System) para detecção de micobactérias. A sensibilidade e especificidade são variáveis e dependentes da sequência alvo (Ajbani et al., 2011; Bang et al., 2011).

Recentemente, o Xpert MTB/RIF, totalmente automatizado, foi desenvolvido a fim de reduzir o tempo de análise das amostras. A identificação da micobactéria, assim como em outros ensaios moleculares, baseia-se na amplificação de uma sequência alvo específica (Boehme et al., 2010).

Boehme et al. (2010) avaliaram a performance do Xpert MTB/RIF. Foram estudados 1730 pacientes com suspeita de tuberculose sensível ou multirresistente ao tratamento. O ensaio foi realizado uma única vez em escarro de cada paciente. O teste identificou 98% dos casos de tuberculose que também apresentaram crescimento de

micobactérias em meio de cultura, incluindo 72% dos casos que apresentaram baciloscopia negativa. O ensaio apresentou uma especificidade de 99%. Adicionalmente, o teste de sensibilidade a rifampicina obteve cerca 97% de concordância quando comparado com o ensaio fenotípico. Theron et al. (2011), entretanto, observaram que, alguns pacientes infectados com MTB e HIV podem apresentar resultado falso-negativo. Logo, indivíduos portadores do HIV, com exame negativo para MTB no Xpert MTB/RIF, devem ser analisados com mais cautela.

Armand et al. (2011), compararam a sensibilidade do Xpert MTB/RIF com a amplificação da IS6110, pela PCR em tempo real, na detecção de MTB. Um total de 117 isolados clínicos, sendo 97 positivos na cultura para MTB e 20 negativos. Dos 97 isolados positivos em cultura, 36 apresentaram bacterioscopia positiva, enquanto que 61 isolados não apresentaram BAAR. Ainda, entre as amostras positivas na cultura, 60 eram respiratórias, e 37 foram colhidas de outras regiões. Apenas 4 amostras continham micobactérias resistentes a rifampicina. Ambos os métodos apresentaram alta especificidade. Entretanto, a amplificação da IS6110 apresentou-se mais sensível na detecção de MTB entre indivíduos paucibacilares.

1.2. Bacteriófagos

Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias e utilizam a maquinaria bacteriana para multiplicar o próprio material genético (Hanlon et al., 2007). Estes vírus são encontrados de forma abundante em águas, solos e ar. Uma vez no interior da célula, os bacteriófagos podem simplesmente integrar o próprio material genético no DNA celular em um processo denominado lisogenia, ou imediatamente iniciar o ciclo

lítico induzindo a célula hospedeira a produzir todos os componentes virais com posterior lise celular. As novas partículas virais infectam novas células e iniciam um novo ciclo. Esta capacidade antibacteriana tem sido bastante explorada desde a descoberta destes vírus por Frederick Twort em 1915 e Felix d'Herelle em 1917.

Os bacteriófagos tem se apresentado como uma valiosa ferramenta no desenvolvimento de técnicas e formas de tratamento mais acessíveis. Estes vírus tem sido propostos como uma alternativa ao uso de antibióticos em infecções humanas, controle da flora bacteriana em escarro para testes diagnósticos (Kumar et al., 2007, Subramanyam et al., 2010) e detecção de micobactérias.

Micobacteriófagos tem sido utilizados no desenvolvimento de novos ensaios para detecção de micobactérias e elucidação das interações gênicas entre micobactérias e fagos (Bai et al., 2011; Huang et al., 2011). Recentemente, o genoma de 64 micobacteriófagos foi disponibilizado por Joseph et al. (2011). Esta base de dados pública (http://mpgdb.ibioinformatics.org/genome_functions.php) contribuirá para o compartilhamento de informações sobre funções de genes, possíveis alvos de novas drogas e comparações entre diferentes micobacteriófagos.

1.2.1. Aplicações dos bacteriófagos

a)Terapia fágica

O tratamento de infecções bacterianas com antibióticos de forma descontrolada culminou na rápida seleção de microrganismos altamente resistentes. Bacteriófagos tem sido sugeridos como uma oportunidade atrativa no desenvolvimento de novas

alternativas no combate e prevenção de doenças causadas por bactérias (Silva et al., 2009).

Terapia fágica é o uso de fagos líticos para tratar ou prevenir infecções bacterianas. Esta alternativa de tratamento foi descrita cerca de 10 anos antes da antibioticoterapia. Entretanto, a descoberta de antibióticos reduziu os investimentos na pesquisa de fagos nos Países ocidentais, principalmente devido ao pouco conhecimento sobre a biologia de fagos e, também, aos promissores resultados clínicos e financeiros obtidos com o uso de antibióticos (Burrowes et al., 2011).

Nos países do leste europeu, fagos tem sido utilizados por mais de 60 anos como uma importante alternativa aos antibióticos devido a baixa citotoxicidade e facilidade de produção (Burrowes et al., 2011).

O isolamento de novos fagos com o intuito de combater bactérias que se tornaram resistentes a vírus previamente utilizados é bastante simples e de baixo custo. Haverá sempre um novo fago para cada bactéria. Devido à relativa facilidade de isolamento, uma grande variedade de fagos pode ser utilizada para combater infecções e evitar o surgimento de resistência (Sillankorva et al., 2009).

Dados obtidos por McVay et al. (2007) no tratamento de camundongos queimados, infectados com *Pseudomonas aeruginosa*, indicaram que a administração intraperitoneal de fagos foi mais eficiente do que a administração intramuscular na eliminação do agente infeccioso sugerindo que a rota de entrada do fago é fundamental no tratamento. Além da via de administração, o desenvolvimento de fagos que resistam ao sistema reticuloendotelial por mais tempo tem sido estudado. Merrill et al. (1996) e Capparelli et al. (2007) realizaram ensaios de passagem múltiplas de fagos pelo

sistema reticuloendotelial de camundogos. Fagos resistentes ao sistema não perderam a capacidade de infectar bactérias e permaneceram viáveis por mais tempo nos camundogos. O uso de fagos resistentes a eliminação precoce aumenta consideravelmente o tempo necessário para administração de bacteriófagos e facilita o tratamento.

Em relação aos antibióticos, o surgimento de resistência requer o desenvolvimento de uma nova molécula, um processo longo e extremamente caro. Devido ao grande investimento empregado, novos antibióticos aumentam o custo do tratamento e, conseqüentemente, os gastos com a saúde (Dinakaran et al., 2008; Freire-Moran et al., 2011).

Apesar de vantagens em relação aos antibióticos, algumas considerações devem ser observadas quanto ao uso destes vírus no tratamento de infecções bacterianas. É importante diagnosticar o agente causador da infecção e testá-lo contra um painel de bacteriófagos a fim de serem selecionados os melhores fagos para o tratamento. É também importante a obtenção de vírus bem caracterizados, que sejam estritamente líticos a fim de evitar transferências de fragmentos de DNA entre fagos e bactérias. Por fim, o sequenciamento completo do genoma de fagos previne o carregamento de genes de virulência, ou resistência, de fagos para bactérias (Silva et al., 2009).

Para eliminação de bactérias residentes em macrófagos é necessário o uso de um carreador de fagos a fim de transportar bacteriófagos para o interior das células. Broxmeyer et al.(2002), utilizaram pela primeira vez, *in vitro*, *M. smegmatis* como carreador de fagos a fim de matar *M. tuberculosis* e *M. avium* dentro de macrófagos e

obtiveram resultados promissores. A eficácia do carregamento de fagos *in vivo*, por micobactéria não virulenta, para macrófagos infectados com *M. avium*, foi analisada por Danelishvili et al., (2006) e corroboraram com os dados previamente descritos por Broxmeyer et al.(2002).

Bacteriófagos, provavelmente, jamais substituirão antibióticos. Entretanto, com o aumento da incidência de bactérias multirresistentes, a terapia fágica terá grande utilidade na complementação de tratamentos bem estabelecidos.

b) Identificação bacteriana e perfil de resistência aos fármacos

O uso de bacteriófagos no estudo da sensibilidade aos fármacos bem como na detecção de micobactérias em isolados clínicos é bastante promissor. Pesquisas têm descrito técnicas que empregam o gene da luciferase e da proteína verde fluorescente (Jacobs Jr. et al., 1993; Piuri et al., 2009; Rondon et al., 2011) bem como bacteriófagos sem qualquer recombinação (Phulpoto et al., 2005).

Bacteriófagos tem sido utilizados na identificação de Mtb de forma rápida e com baixo custo. O fast plasque TB test (FPTB) é um teste baseado no uso de micobacteriófagos sendo bastante sensível e específico no diagnóstico da tuberculose em associação com a baciloscopia. Único ensaio comercialmente disponível para detecção de Mtb, além da praticidade, tem um custo três vezes inferior à PCR e tornou-se acessível aos países em desenvolvimento (Albay et al., 2003.; Phulpoto et al., 2005; Barman e Gadre, 2007).

Biswas et al. (2008) estudaram a sensibilidade e especificidade do FPTB na detecção de Mtb em lavado bronquioalveolar ou biopsia pleural de 139 indivíduos

paucibacilares. Os resultados foram comparados a cultura e esfregaço em lamina. O FPTB obteve uma sensibilidade de 58,8%, especificidade de 97,9%, valor preditivo positivo de 98,1% e negativo de 56,5%. A sensibilidade e especificidade do FPTB foram levemente superiores ao esfregaço e inferior a cultura bacilar em meio LJ.

Bacteriófagos expressando proteínas fluorescentes tem sido desenvolvidos com o intuito de aumentar a sensibilidade e reduzir o tempo de diagnóstico para menos de 24h. Pearson et al. (1996) observaram que a inserção do gene no braço direito do D29 manteve o fago sem alterações significativas quando comparado com o D29 selvagem. Adicionalmente, os bacteriófagos que apresentaram a direção da leitura gênica do inserto da direita para a esquerda obtiveram uma melhor expressão da proteína quando comparados com fagos cujo gene foi inserido no outro sentido.

Banaiee et al. (2008) avaliaram um método semi automatizado de sensibilidade as drogas rifampicina e isoniazida utilizando micobacteriófagos recombinantes que expressam luciferase (LRP). Um total de 191 isolados clínicos foram testados e os resultados comparados com os dados obtidos pelo BACTEC 460. Os resultados foram concordantes em 100% dos casos para rifampicina e 96,9% para isoniazida. Os seis resultados que apresentaram discrepância entre os dois métodos foram adicionalmente avaliados pelo método das proporções. Destes, dois apresentaram concordância com o LRP. A sensibilidade do LRP para identificação de cepas multirresistentes foi de 100% para ambas as drogas. Além da praticidade e baixo custo, os testes com LRP foram liberados em 48 horas enquanto que com o BACTEC 460 em cerca de 9 dias.

Em estudo semelhante, Dusthacker et al. (2008) inseriram o gene da luciferase nos micobacteriófagos Che 12 e TM 4 com o intuito de detectar *M. tuberculosis* em

amostras clínicas. Os fagos recombinantes expressaram a luciferase em microrganismos nas fases latentes e ativa.

Genes que codificam proteínas fluorescentes também tem sido inseridos em bacteriófagos com o objetivo de melhorar a especificidade de fagos recombinantes. O desenvolvimento de micobacteriófagos expressando a proteínas fluorescentes facilita o diagnóstico laboratorial da doença sem a necessidade da adição de um agente revelador como ocorre com os micobacteriófagos que expressam a luciferase (Randon et al., 2011).

A principal proteína estudada, a eGFP, é um monômero de 238 aminoácidos e 27 KDa emitindo fluorescência verde (509 nm) quando exposta a luz azul (488 nm). Esta proteína tem sido utilizada no estudo do ciclo biológico de parasitas, testes antivirais (Roth et al., 2009) e como marcador de expressão gênica (Chalfie et al., 1994.;Changsen et al., 2003).

Piuri et al. (2009) utilizaram o cosmídio pMP14 contendo o gene da proteína verde fluorescente (*eGFP*) e o fagemídio pHAE87 para construir fluoromicobacteriófagos e desenvolver um novo teste de sensibilidade aos fármacos. Fluoromicobacteriófagos foram adicionados em culturas de *Mycobacterium tuberculosis* contendo rifampicina ou streptomina e incubados por 16 horas. Micobactérias resistentes as drogas apresentaram-se fluoresecetes demonstrando que os micobacteriófagos fluorogênicos podem ser utilizados para detecção de resistencia em cepas de *M. tuberculosis*.

Um estudo com estes bacteriófagos foi realizado por Randon et al. (2011) para detecção de resistencia micobacteriana a isoniazida (INH), rifampicina (RIF) e

streptomicina (STR). Os resultados de susceptibilidade, obtidos de 155 isolados clínicos, foram comparados com os obtidos pelo ensaio em microplaca com resazurina (REMA) utilizando-se o método das proporções como padrão. O REMA obteve 97% de sensibilidade para INH, 95% para RIF e 98% para STR. A sensibilidade dos micobacteriófagos fluorescentes foi de 94% para todas as drogas, enquanto que a especificidade foi de 90% para INH, 93% para RIF a 95% para STR. O custo para o teste de susceptibilidade as drogas dos três fármacos foi de aproximadamente \$2.00. Os resultados foram disponibilizados em 28 horas para RIF e STR e 72 horas para INH.

c) Controle da flora bacteriana normal

Bacteriófagos tem sido utilizados na prevenção do crescimento da flora bacteriana normal em amostras de escarro processadas com 4% de NaOH. Kumar et al., (2007) isolaram bacteriófagos capazes de impedir o crescimento de bactérias da flora normal que sobrevivem ao processo de descontaminação do escarro e interferem na cultura de micobactérias, principalmente quando o ensaio é realizado em meio líquido ou quando micobacteriófagos são utilizados na detecção de MTB. Kumar et al., (2007) avaliaram 100 amostras processadas pelo método de Petroff. Um total de 26 amostras analisadas apresentaram crescimento de bactérias contaminantes em Agar sangue, após a descontaminação. Mas, o cultivo em meio líquido, na presença dos fagos, preveniu o crescimento da flora contaminante.

O controle de bactérias indesejadas em amostras de escarro também foi descrito por Subramanyam et al., (2010). Além de bacteriófagos, o grupo utilizou lisinas, enzimas expressas por bacteriófagos fundamentais para a lise de bactérias durante o ciclo lítico. A combinação de fagos suplementados com lisina não apresentou efeito inibitório contra Mtb, mas inibiu o crescimento de outras bactérias. Os resultados sugerem que fagos em combinação com lisina podem ser utilizados em substituição aos antibióticos, no controle de bactérias não desejadas durante a cultura de micobactérias.

1.3. Introdução de genes em micobactérias

1.3.1. Recombinação clássica em micobactérias

A recombinação gênica é fundamental no estudo do funcionamento de genes, pois permite inserções, deleções, mutações pontuais e aumento da expressão de genes. Entretanto, a recombinação em micobactérias de crescimento lento, especialmente o *M. tuberculosis* é bastante difícil devido à alta taxa de recombinação ilegítima, a tendência de crescimento em grumos, e a espessa parede celular, a qual dificulta a entrada de DNA (Larsen et al., 2007; Medjahed e Reytrat, 2008). Além dos fatores anteriormente mencionados, a necessidade de um laboratório de nível de biossegurança três e a velocidade de crescimento dessas micobactérias tornam a recombinação em micobactérias de crescimento lento bastante laboriosa (Van Kessel et al., 2008). Diferentemente, *M. smegmatis*, e algumas micobactérias de crescimento

lento, como o *M. intracellulare*, apresentam uma baixa taxa de recombinação ilegítima e taxas de recombinação homóloga maiores que as encontradas em *M. tuberculosis*. Assim, a detecção de recombinantes desejados é facilitada.

Embora análises genéticas de micobactérias sejam mais difíceis do que em outras bactérias, alguns pesquisadores tem publicado métodos de recombinação homóloga em micobactérias. As principais técnicas descritas até então são o uso de vetores suicidas com marcadores de contra-seleção (Husson et al., 1990; Nascimento et al., 2009), transdução especializada (Bardarov et al., 2002) , e mais recentemente, recombinação baseada nas proteínas gp60 e gp61 do micobacteriófago Che9c (Van Kessel et al., 2008).

Husson et al., (1990) descreveram, pela primeira vez, um estudo demonstrando a recombinação homóloga em *M. smegmatis* a partir de plasmídeos, vetores suicidas, com marcadores de contra-seleção. Vetores suicidas apresentam origem de replicação apenas em *E. coli*. Portanto, quando inseridos em *M. smegmatis*, apenas aqueles que se integram ao DNA genômico, por recombinação homóloga, são mantidos na bactéria e posteriormente selecionados.

No estudo realizado por Husson et al., (1990), o gene *pyrF* foi substituído pelo *KanR*, o qual continha longas sequências nucleotídicas homólogas ao gene *pyrF* em ambos os lados. Na ausência do *pyrF*, *M. smegmatis* é auxotrófico para uracil e resistente ao ácido fluorótico. Estas características permitem uma seleção tanto negativa como positiva de bactérias recombinantes. Nesta técnica clássica, eventos de recombinação podem ser de dois tipos: *crossover* simples ou duplo. No *crossover* simples, todo o plasmídeo é integrado ao genoma da célula, enquanto que no

crossover duplo, apenas a região de interesse. No caso do *crossover* simples, a bactérias contendo o plasmídeo pode ser selecionada e utilizada em um segundo evento de recombinação a fim de manter apenas a região de interesse (Fig.1).

A idéia de Husson e colaboradores foi aprimorada, principalmente para utilização de novos marcadores e recombinação gênica em outros locais do genoma (Marx, 2009). A principal evolução desta técnica é a utilização do gene *sacB*, do *Bacillus subtilis*, o qual confere sensibilidade a sacarose e permite seleção negativa e positiva para sacarose e algum antibiótico, respectivamente, conforme demonstrado na figura 2. Adicionalmente, a obtenção de mutantes não marcados, ou seja, sem genes de resistência ou genes utilizados na identificação de recombinantes, pode ser efetuada adicionando-se sítios de reconhecimento da enzima recombinase em ambos os lados dos genes de seleção. Após a identificação de recombinantes, a recombinase poderá ser utilizada na excisão dos genes previamente utilizados na seleção de recombinantes, não mais necessários. Esta etapa é fundamental em caso do recombinante ser utilizado na produção de vacinas ou qualquer outro produto a ser comercializado (Nascimento et al., 2009).

Fig. 1. Recombinação por *crossover* simples e duplo em micobactérias.

Fig 2. Recombinação com plasmídeos e marcadores de contra-seleção. 1-2. Cassete com regiões homólogas ao DNA genômico sofre *crossover* duplo. 3. Os genes *Hyg* e *sacB* facilitam a identificação e purificação de recombinantes. 4. Os genes *Hyg* e *SacB* são retirados do genoma por ação de resolvases.

1.3.2. Produção de fagemídeos

A primeira técnica desenvolvida para introdução de genes em micobactérias a partir de fagos foi descrita por Jacobs et al. (1987). O DNA do micobacteriófago TM4 foi ligado com a enzima T4 ligase para formar concatâmeros e, em seguida, parcialmente digerido com a enzima *Sau3A* para produção de fragmentos de 30-50kb. Estes

fragmentos foram, então, ligados ao cosmidio pH79. O produto desta ligação foi encapsulado com as proteínas do fago lambda e utilizado para infectar *Escherichia coli*. Bactérias infectadas produziram fagemídios, que funcionam como plasmídeo em *E. coli* e bacteriófagos mutantes em cepas de micobactérias. Os fagemídios produzidos em *E. coli* foram eletroporados em células de *M. smegmatis* mc² 155 para seleção de fagemídios funcionais com atividade biológica semelhante ao micobacteriófago TM4 e expressando o gene de interesse (Fig. 3).

Fagemídeos foram posteriormente aprimorados a fim de facilitar a identificação e a quantidade de recombinantes produzidos. Balasubramanian et al. (1996), a partir dos estudos de Jacobs et al., (1987) desenvolveram fagemídeos (pHAE87) capazes de replicarem-se como micobacteriófagos a 30°C em *M. smegmatis*, e produzir fagos em grande quantidade. Estes fagemídeos, contendo o cassete de recombinação, foram utilizados para infectar *M. smegmatis* a 39°C. Nesta temperatura os fagemídeos não produzem fagos e bactérias recombinantes podem ser selecionadas (Fig. 4).

Assim como os sistemas de recombinação que utilizam plasmídeos, a sequência a ser recombinada precisa ser previamente inserida no fagemídeo com longas sequências homólogas (700-1000pb) a região de inserção, tornando todo o processo de recombinação difícil e trabalhoso.

Além de sua utilização na deleção e inserção de genes em micobactérias, este procedimento tem sido utilizado para construção de fagos expressando genes codificadores de proteínas facilmente detectáveis no interior das micobactérias ou em meio de cultura, tais como luciferase e proteína verde fluorescente para o diagnóstico rápido da tuberculose (Pearson et al., 1996; Piuri et al., 2009).

Todos os fagemídeos recombinantes produzidos com o objetivo de detectar micobactérias (Jacobs Jr et al., 1993; Sarkis et al., 1995; Pearson et al., 1996; Kumar et al., 2008; Piuri et al., 2009), até então, basearam-se na técnica previamente descrita por Jacobs Jr et al. (1987). Apesar de gerar bons resultados, o desenvolvimento de fagemídeos demanda muito tempo e exige muitas etapas (Kumar et al., 2008). Esta técnica não permite o controle sobre onde o cosmidio contendo o gene de interesse é inserido. Um intenso trabalho de seleção de mutantes funcionais, que não perderam genes essenciais, deve ser efetuado após os procedimentos de clonagem.

Fig.3 Produção de fagemídeos para inserção, deleção e expressão de genes em micobactérias. 1 e 2. DNA genômico de fago é ligado pela T4 ligase, 3 e 4. Restrição parcial do DNA concatenado, para produção de fragmentos entre 30-50kb, e do cosmídeo com a mesma enzima de restrição, 5. Encapsulamento de DNA, 6 e 7. Infecção e extração de fagemídeos, 8. Eletroporação de *M. smegmatis* para detecção de fagemídeos funcionais.

Fig. 4. Produção de bactérias recombinantes a partir de fagemídeos. 1. Infecção de *M. smegmatis* com fagemídeos recombinantes contendo o cassete recombinação, 3. Fagemídeos produzidos infectam *M. smegmatis* a 39°C, 5. Recombinantes são detectados e purificados.

1.3.3. Recombinação alélica

Van Kessel e Hatfull (2007) analisaram trinta micobacteriófagos e identificaram os genes gp60 and gp61 no fago Che9c com 30% de homologia aos genes do fago λ que codificam para as proteínas RecE e RecT, utilizadas para recombinação em *E. coli*. A descoberta destes genes facilitou a recombinação alélica em micobactérias.

Marinelli et al. (2008) utilizaram o plasmídeo pJV53 contendo os genes do fago Che9c indutores de recombinação em micobactérias. Além de inserir genes, mutações ou deleções exatamente na região de interesse, a metodologia é mais simples que a anteriormente descrita.

O fragmento a ser inserido deve conter sequências de 100pb homólogas ao DNA do bacteriófago, em ambos os lados. O DNA do bacteriófago e a sequência de interesse são simultaneamente eletroporados em células de *M. smegmatis*::pJV53 eletrocompetentes. As células são semeadas e a presença de micobacteriófagos mutantes detectada pela PCR. Como a recombinação ocorre em algum momento da replicação do DNA do fago, os halos de inibição primários formados apresentam bacteriófagos mutantes e selvagens (Bai et al., 2011; Van Kessel et al., 2008).

A fim de se obter bacteriófagos mutantes puros, os halos de inibição formados são coletados individualmente e utilizados em uma nova infecção bacteriana (Fig. 5 e 6). Este procedimento é realizado até que apenas a banda de DNA correspondente ao bacteriófago mutante seja observada na eletroferese em gel de agarose (Marinelle et al., 2008).

Fagos recombinantes estarão sempre em menor quantidade nos halos de inibição e o tempo necessário para identificação é fortemente dependente da estratégia de detecção pela PCR, do desenho dos iniciadores e do tamanho das sequências nucleotídicas a serem inseridas. Insertos superiores a 500 pb requerem uma grande quantidade de reações de PCR para identificação de recombinantes em halos de inibição primários e, por vezes, novas eletroporações (Marinelle et al., 2008).

Fig. 5. Produção do inserto para recombinação homóloga (Van Kessel et al., 2007). 1-3: Produto da PCR para inserção de DNA ou deleção. 4-5. O produto da PCR purificado é eletroporado na bactéria, juntamente com o DNA do micobacteriófago para recombinação.

Fig. 6. Detecção e purificação de fagos recombinantes. Pela PCR, 1-4. Bactérias previamente eletroporadas com DNA de micobacteriófagos e do inserto são cultivadas e PCR dos halos de inibição individualizados são efetuadas para detecção de recombinantes. 8-9. Recombinantes são confirmados por sequenciamento de DNA e produzidos em maior quantidade. 5-7. Micobacteriófagos são inoculados em bactérias com e sem plasmídeos contendo o gene complemento. O fago recombinante é confirmado pela PCR e sequenciamento.

1.4. Micobacteriófago D29

O micobacteriófago D29, um dos primeiros a ter o genoma sequenciado, apresenta fita dupla de DNA com 49.136 pb, 77 ORFs e 5 tRNAs (Ford et al., 1993). O D29 inicia a replicação de DNA logo após a infecção da micobactéria lisando-a em cerca de 90 minutos. Este rápido ciclo lítico sugere que o genoma do fago é rapidamente amplificado, juntamente com a produção de proteínas.

Este fago tem sido comercialmente utilizado para o diagnóstico rápido da tuberculose, bem como em testes de sensibilidade as drogas (Singh et al., 2008).

O tamanho do genoma do fago D29 é característico de micobacteriófagos. Por ser linear, apresentar extremidades coesivas e um genoma de cerca de 50.000 pb é possível utilizá-lo para produção de fagemídeos (Pearson et al., 1996).

2. Objetivos

- 1) Inserir o gene da proteína verde fluorescente (eGFP) no DNA do micobacteriófago D29.
- 2) Realizar estudos comparativos na detecção de micobactérias com o bacteriófago D29 e o fago recombinante.
- 4) Avaliar alternativas para o aumento da expressão da eGFP pelo bacteriófago.

3. Material e métodos

3.1. Produção de *Escherichia coli* DH5α competentes

Células competentes foram obtidas de acordo com Sambrook e Russel (2001) com algumas alterações. Uma colônia de *E. coli* DH5α foi transferida para 5ml de meio LB e incubada por 16h/37°C. 250 ml de meio LB foram inoculados com 100 µl da cultura e incubado a 37°C/250rpm até a cultura atingir uma densidade ótica de 0.4 a 600nm. A cultura foi mantida em gelo por 20 min e centrifugada por 10min/4°C/4000 rpm (Eppendorf 5804R, Hamburg, AL) O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em 30 ml de solução a 4°C contendo 80mM de MgCl₂ e 20 mM de CaCl₂. A amostra foi centrifugada e o precipitado suspenso em 10ml de CaCl₂ a 100 mM, refrigerado. A solução foi mantida a 4°C por 20 min, centrifugada e suspensa em 3 ml de solução contendo CaCl₂ a 100 mM e 15% (V/V) de glicerol. As bactérias competentes foram aliquotadas e armazenadas a - 80°C até o momento do uso.

3.2. Plasmídeos

Os plasmídios pYL-eGFP, pYL37-eGFP, pJV53 e pNIT foram produzidos em *E. coli* DH5α. Bactérias contendo plasmídeos foram cultivadas em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) contendo 30 µg/ml de canamicina (GibcoBRL, Carlsbad, CA, EUA) e incubados por 16h/37°C. O DNA plasmidial foi extraído com o kit Qiaprep (Qiagen, Hilden, AL) de acordo com as instruções do fabricante. Para extração de plasmídeos de micobactérias, as amostras foram previamente tratadas com lizosima a 20 mg/ml (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) por 3h/37°C.

3.3. Produção de estoque de micobacteriófagos

Um volume de 100 µl da suspensão do micobacteriófago em uma concentração aproximada de 10^7 PFU/ml foi adicionado a 900 µl ml de *M. smegmatis* em uma concentração de 10^7 UFC/ml e incubado em temperatura ambiente por 20 min. Adicionou-se 9 ml de Middlebrook 7H9 semi sólido (0,75% de agar) suplementado com 10% OADC e 1 mM CaCl_2 . A mistura resultante foi distribuída em placas de Petri de 150 mm contendo ágar 7H10 suplementado com 10% de OADC e 1 mM de CaCl_2 . Após 24 h de incubação a 37°C, 10 ml de tampão SM (Tris-HCl 10mM pH 7.6, MgSO_4 10mM, NaCl 68,5mM) foram adicionados e as placas de Petri armazenadas por 4h/37°C. A seguir, o líquido resultante foi aspirado e centrifugado por 10 min/5.000rpm/4°C (Eppendorf 5804R, Hamburg, AL). O sobrenadante foi filtrado em membranas Millipore de 0.45µm (Billerica, MA, EUA) e centrifugado a 22000 rpm por 2h em ultracentrífuga Beckman, rotor 60TI (Beckman, Fullerton, CA, EUA). A solução foi descartada e o precipitado, contendo bacteriófagos, suspenso em 300 µl de tampão de fago (Ford et al., 1998). Aliquotas de 100µl foram armazenadas a 4°C.

3.4. Quantificação do micobacteriófago pelo método tradicional.

Uma diluição decimal em série foi efetuada a partir de uma solução de bacteriófagos de concentração desconhecida. Uma alíquota de 100 µl de cada diluição foi transferida para tubos de ensaio contendo 400 µl de *M. smegmatis* mc² 155, em fase exponencial de crescimento, e incubados em temperatura ambiente por 20 min.

Adicionou-se 4,5 ml de Middlebrook 7H9 com 0,75% de agar, suplementado com 10% de OADC e CaCl_2 a 1 mM.

Fig. 7. Quantificação de bacteriófagos pelo método tradicional. (1) e (2), diluição seriada do estoque de bacteriófagos. (3), Adição de 400 µl de *M. smegmatis* mc² 155. (4), Incubação a 37°C/15 min. (5) e (6) adição de meio 7H9 contendo 0,75% de Agar, 10% ADC e CaCl_2 a 1 mM. (7) e (8), incubação e contagem de bacteriófagos.

A mistura foi homogeneizada e colocada em placas de Petri de 90 mm contendo ágar 7H10 suplementado com 10% de OADC e CaCl_2 a 1 mM. Após 24h/37° C, placas

que apresentaram entre 30 e 300 halos de inibição foram utilizadas pra quantificação de fagos (Fig. 7). Os resultados foram expressos em PFU/ml (Piuri et al., 2009).

3.5. Quantificação de micobacteriófago pela reação da polimerase em cadeia em tempo real.

3.5.1. Amplificação de um fragmento de DNA do fago D29.

Uma sequência de 69pb do fago D29 foi amplificada pela PCR utilizando-se 10 pmol dos iniciadores D29FW 5'-CTGCACCAACCCGAATCG-3' e D29Rv 5'-GCCTTGAAATCGTCTGACTCATG-3' (IDT, Coralville, IA, EUA), 0,2 mmol/L de dNTPs (Amerschan Bioscience, NJ, EUA), 2 U de Taq DNA polimerase (Biotools, Madri, Espanha), tampão de PCR (Biotools, Madri, Espanha), 10 ng de DNA de fago D29 e água MilliQ estéril para um volume total de 50 µl.

O programa da PCR foi constituído de: um ciclo de 5 min a 95°C, 30 ciclos (30seg. 95°C, 45seg. 60°C, 1 min. 72°C) e 10 min a 72°C (Applied Biosystems 2720 thermal cycler, Foster City, CA, EUA).

O produto da PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 3% utilizando-se tampão TBE 0,5X (Tris-HCl a 45 mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1mM), pH 8,0.

3.5.2. Clonagem e identificação de plasmídeos

Para clonagem do inserto foi utilizado o Kit pGEMT easy vector (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. O volume total da reação foi homogeneizado com 90 µl de células *E. coli* DH5α competentes e mantido em gelo por 30 min. A solução foi aquecida a 42°C por 45 seg. e imediatamente transferida para o gelo por 2 min. As bactérias foram transferidas para tubos de ensaio contendo 700 µl de meio LB, suplementado com 200 µl de glicose 1 M, 100 µl de MgCl₂ a 1 M e incubadas por 1h/37°C/250rpm.

Alíquotas de 100 µl de células transformadas foram semeadas em placas de Petri com 20ml de ágar LB contendo 100 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubadas por 24h/37°C. Colônias isoladas foram transferidas para 5 ml de meio LB com 100µg/ml de ampicilina e incubadas por 16h/37°C/250rpm. A extração de plasmídeos foi realizada com o Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, AL), de acordo com as recomendações do fabricante apenas nas amostras que apresentaram crescimento bacteriano (Sambrook e Russel., 2001).

Para confirmação da clonagem, foi feita uma restrição enzimática com a enzima *EcoRI* (Biotools, Madri, Espanha), a qual corta o plasmídeo em regiões que flanqueiam o inserto. Plasmídeos que receberam o inserto apresentaram o fragmento de 69 pb após restrição enzimática.

A clonagem foi confirmada pelo sequenciamento de DNA no Centro de Estudos do Genoma Humano (<http://genoma.ib.usp.br/servicos/sequenciamento.php>) utilizando o ABI 3730 DNA Analyser e o BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.5.3 Construção da curva padrão

Uma alíquota de plasmídeos foi quantificada em ng/μl no espectrofotômetro (nanodrop ND-100). O peso em Daltons (g/mol) de uma molécula do plasmídeo foi obtido no programa Oligocalculator, gratuitamente disponível no site <http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>.

Com os dados obtidos no programa, a seguinte fórmula foi utilizada para calcular o número de cópias de plasmídeos: $(\text{g/mol}) / \text{número de Avogadro} = \text{g/molécula} = \text{número de cópias}$ (Whelan et al., 2003).

Uma diluição seriada decimal foi realizada em tampão Tris-HCl 10 mM. As amostras foram armazenadas a 4°C até o momento do uso. Com o objetivo de avaliar a estabilidade da curva padrão, as amostras foram quantificadas em triplicatas, por três vezes consecutivas, em um único dia, uma vez por semana em um período de um mês e uma vez ao mês durante seis meses.

3.5.4. Quantificação de fagos pela qPCR em tempo real.

Os mesmos iniciadores utilizados na etapa de clonagem do fragmento de 69 pb do fago D29 foram utilizados para quantificação absoluta de fagos. Uma diluição decimal seriada foi realizada com alíquotas de bacteriófagos em concentração desconhecida a fim de que pelo menos uma diluição obtivesse uma amplificação dentro da região linear da curva padrão.

Para reação de qPCR em tempo real utilizou-se 12,5 µl de 2X Sybr Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5 pmol dos iniciadores D29Fw e D29Rv (IDTDNA, USA), 2µl de amostra e água Milli-Q para um volume total de 25 µl. O programa utilizado para amplificação de DNA foi: uma etapa inicial de 10 min a 95 °C, 35 ciclos (20 seg. 95°C, 30 seg. 60°C) e 10 min a 60 °C.

Todas as amostras e os pontos da curva padrão foram quantificados em triplicatas. O ensaio foi realizado no 7500 Real-Time PCR system e os resultados analisados no programa 7500 System SDS software v.1.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.6. Extração do DNA de bacteriófago

A extração de DNA foi feita de acordo com Piuri et al., 2009 com algumas adaptações. Cerca de 300 µl de bacteriófago em tampão de fago foram transferidos para tubos de 1,5 ml. Um volume igual de fenol clorofórmio equilibrado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado, homogeneizado e centrifugado por 5 min/13000 rpm (Eppendorf 5415R, Hamburg, AL). A fase aquosa foi recuperada para um novo tubo e o procedimento repetido por 2 vezes. Foi adicionada a fase aquosa 1 volume de clorofórmio:alcool isoamílico (24:1), homogeneizado e centrifugado por 5 min/13000 rpm. A fase aquosa foi recuperada para um novo tubo e o procedimento repetido até que a solução se tornasse límpida.

Para a precipitação do DNA, adicionou-se 0,1 volume de acetato de sódio a 3 M e 2.5 volumes de etanol absoluto gelado. A amostra foi resfriada em gelo seco por 20

min. e centrifugada por 30min/4°C/14000rpm (Eppendorf 5415R, Hamburg, AL). O sobrenadante foi descartado e 1ml de etanol 70% gelado foi adicionado ao precipitado. A solução foi centrifugada a 14000rpm/10min e o sobrenadante descartado. O DNA foi suspenso em 100 µl de Água Milli-Q, e armazenado a -80 °C até o momento do uso.

3.8. Inserção do Hsp60-GFP e GFP no bacteriófago D29 por recombinação em micobacteriófagos por eletroporação de DNA.

*3.8.1 Produção de *M. smegmatis* mc² 155::pJV53 eletrocompetentes*

Para produção de *M. smegmatis* mc² 155::pJV53 eletrocompetentes, 3 ml de meio 7H9 contendo 10% OADC; 0,05% Tween 80 e canamicina (30µg/ml) foram inoculados com 50µl de *M. smegmatis* mc² 155::pJV53. A cultura foi incubada por 37°C/48h. Um volume de 1ml foi transferido para 100ml de meio indutor (7H9/canamicina 30µg/ml/1mM CaCl₂/0,2% ácido succínico) a fim de se obter uma densidade ótica (D.O) de aproximadamente 0,02. A cultura foi incubada por 18-24h/37°C/250rpm ou até atingir uma D.O de 0,4. Acetamidase, para uma concentração final de 0,2% foi adicionada e a cultura novamente incubada por 3h/37°C/250rpm (Van Kessel et al., 2008; Marinelli et al., 2009).

Após o período de incubação, a cultura foi colocada em gelo por 30 min. e centrifugada por 10min/5000rpm/4°C (Thermo RC5C, USA). O sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido por 4 vezes com glicerol a 10% gelado (Fig. 8).

O precipitado final foi suspenso em 2ml de glicerol 10%, aliquotado em volumes de 110µl e mantidos a – 80°C até o momento do uso (Piuri et al., 2009).

Fig. 8. Produção de *M. smegmatis* mc² 155:pJV53 eletrocompetentes para recombinação.

3.8.2. Identificação e deleção de regiões do genoma do D29.

A identificação de regiões do micobacteriófago D29 que podem, possivelmente, receber insertos ou serem deletadas sem provocar alterações no ciclo biológico do fago foi avaliada comparando-se o genoma do D29 com o do fago L5 obtidos no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Todos os oligonucleotídeos utilizados neste experimento foram obtidos da IDT, Coralville, IA, EUA. Um fragmento de 100 pb(F1) homólogo a região de interesse foi sintetizado e iniciadores de 25pb com caldas de 75pb também homólogas a região foram utilizados para amplificar F1 (Tab. 2). A amplificação foi efetuada com a polimerase PFU (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). O programa de PCR foi constituído de: um ciclo de 5 min a 95°C, 25 ciclos (30 s a 95°C, 30 s a 57°C , 1 min a 72°C) e 10 min a 72°C. O produto de PCR de 200pb foi confirmado por eletroforese em gel de agarose a 1%.

3.8.3. Eletroporação do D29 e do fragmento de 200pb em células de *M. smegmatis mc² 155::pJV53*.

O DNA do D29 e F1 numa razão molar de 1:3 foram transferidos para 100 µl de células de *M. smegmatis mc² 155::pJV53* eletrocompetentes e mantido em gelo por 15min. A suspensão foi transferida para cubeta de eletroporação de 0,2cm (BioRad, Hercules, CA, EUA) e submetida a um pulso de 2.5 kV, 25 pF e resistência de 1000 Sz (Marinelli et al., 2008).

Após eletroporação, 900ul de 7H9 com 10% de ADC e CaCl₂ a 1mM foram adicionados e o meio incubado por 1h/37°C/250rpm. Após incubação, 9ml de meio contendo 4,5ml de 7H9 com 10% de ADC e 1mM CaCl₂; 4,5ml de 7H9 com 0,75% de ágar e 1mM CaCl₂ foram adicionados e o volume final colocado sobre placas de Petri de 150mm contendo agar 7H10 previamente aquecidas a 37° C. As placas foram incubadas por 24h/37°C para visualização de halos de inibição. A presença de

bacteriófagos mutantes nos halos de inibição foi detectada pela PCR (Marinelli et al., 2008; Morris et al., 2008).

3.8.4. Detecção de micobacteriófagos recombinantes.

Os halos de inibição formados pelos micobacteriófagos foram coletados e transferidos para tubos de 1,5ml contendo 100µl de tampão de fago. Após 1h de incubação em temperatura ambiente, 1µl de cada tubo foi utilizado como substrato da PCR. Os iniciadores D1 e D2 foram desenhados no programa DNASTrider, disponibilizado pelo professor Dr. Christian Marck (jonas.saclay.cea.fr). O programa da PCR foi constituído de: um ciclo 5 min a 95°C, 30 ciclos (30seg. 95°C, 30seg. 59°C, 1 min. 72°C) e 10 min a 72°C (Applied Biosystems 2720 thermal cycler, Foster City, CA, EUA). O produto da PCR de 901pb para fagos selvagens e 529pb para fagos mutantes foi confirmado por eletreforese (50min/100V/ 60mA) em gel de agarose a 1% (GEHealthcare, USA) utilizando-se padrão de 100pb (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) (Piuri et al., 2009).

Tab. 2. Primers e fragmento de 100pb utilizados na amplificação do inserto deleção.

Iniciador	Sequência
100pb	5'-CGTGTTAGTTCAGGAGTTCCTCGATGTCGGGTGGCCAGCACCAGATCATGTGCAGGTTCTGTAGACGAAGA CGCGAATTGGCTTGGGGTTCATGCGATC-3'
D2975pb1	5'-GCGGTTCTTACTGCGTGGGCTCCGCTGGCTACGGAGAACGCACGCGCGTCGTGTTAGTTCAGGAGTTCCTCG AT-3'
D2975pb 2	5'-TTGAGTCGGACCCGACGCTTCAGCGTCAAAGACAACTACCTGGATGACTGGATCGCATGAACCCCAAGCCAA TTC-3'
D1	5'-TACGAAGGTATCGGCGAGCCATC-3'
D2	5'-GCTAGTGAGCGGCATTGCGG-3'

3.8.5. Obtenção de bacteriófagos mutantes puros.

Uma diluição de 10^{-2} a 10^{-12} foi feita com 10µl de cada tubo que apresentou DNA de bacteriófagos mutantes e 100ul de cada diluição foram incorporados a 400µl de cultura de *M. smegmatis* mc² 155 em 7H9/10% de ADC/ CaCl₂ a 1mM. A seguir, 9 ml de meio contendo 4,5 ml de 7H9/ 10% de ADC/ 1mM de CaCl₂; 4,5ml de 7H9 com 0,75% de ágar e 1mM CaCl₂ foram adicionados e o volume final colocado sobre placas de Petri de 150mm contendo ágar 7H10 previamente aquecidas a 37°C. As placas foram incubadas por 24h/37°C para visualização de halos de inibição. Novos halos de inibição foram coletados para PCR. Este processo foi repetido até que apenas a banda de DNA de 529pb, correspondente ao fago mutante, fosse observada após eletroforese em gel de agarose a 1% (Marinelli et al., 2008).

3.8.6 Eletroporação do DNA do D29 e do inserto contendo o *Hsp60-eGFP* ou o *eGFP* em células de *M. smegmatis* *mc*² 155::pJV53.

Os pares de iniciadores (Tab.3) para amplificação da sequência de inserção contendo o *Hsp60-eGFP* e *eGFP* foram desenhados no programa DNASTrider. Dois pares de iniciadores foram desenhados para amplificação da *eGFP* sem a região promotora. A amplificação foi feita em duas etapas. A primeira etapa, com os iniciadores GFP1 e GFP2, amplificou o gene e adicionou 50pb homologos ao DNA do D29 em cada lado da sequência de interesse. O produto da PCR foi purificado com o QIAquick purification Kit (Qiagen,Hilden, AL) de acordo com as recomendações do fabricante. Uma segunda PCR, realizada com o fragmento anterior e os iniciadores D29 75pb-1 e D29 75 pb-2 adicionou mais 50pb em ambos os lados do gene produzindo um fragmento com 100pb de homologia ao D29 em cada lado (Morris et al., 2008).

Para amplificação do cassete *Hsp-eGFP* utilizou-se os iniciadores GFP1 e Hsp-GFP_P na primeira etapa. A segunda etapa foi realizada com os iniciadores D29 75pb-1 e D29 75pb-2 (Tab. 3). Em todas as reações foi utilizada a enzima PFU (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). O programa da PCR foi constituído de: um ciclo 5 min. a 95°C, 30 ciclos (30 seg. 95°C, 30 seg. 57°C, 1 min. 72°C) e 10 min a 72°C (Applied Biosystems 2720 thermal cycler, USA). O produto da PCR foi purificado com Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA) após corrida em gel de agarose 1% (GE Healthcare, USA).

Tab. 3. Iniciadores utilizados para amplificação do cassete *Hsp60-eGFP* e *eGFP* com homologia de 100pb ao DNA do D29 em ambos os lados.

Iniciadores	Sequência
GFP 1	5'-CGTGTTAGTTCAGGAGTTCCTCGATGTCGGGTGGCCAGCACCAGATCATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'
GFP 2	5'-GATCGCATGAACCCCAAGCCAATTTCGCGTCTTCGTCTACAAGAACCTGCACATGGCCAAGACAATTGCGGATCC-3'
Hsp60-GFP_P	5'-GATCGCATGAACCCCAAGCCAATTTCGCGTCTTCGTCTACAAGAACCTGCACTCTAGAGGTGACCACAACGAC-3'
D29 75pb-1	5'-GCGGTTCCCTTACTGCGTGGGCTCCGCTGGCTACGGAGAACGCACGCGCGTCGTGTTAGTTCAGGAGTTCCTCGAT-3'
D29 75pb-2	5'-TTGAGTCGGACCCGACGCTTCAGCGTCAAAGACAACCTACCTGGATGACTGGATCGCATGAACCCCAAGCCAATTC-3'
D3	5'-TACGAAGGTATCGGCGAGCCATC-3'
D4	5'-GCTAGTGAGCGGCATTGCGG-3'
D5	5'-GCTGCTGCCCCGACAACCACT-3'
D6	5'-CGGCTGGGCATGAACCCCTG-3'

A eletroporação, identificação e purificação de bacteriófagos mutantes contendo a sequência de interesse foram efetuadas de acordo com os procedimentos anteriormente descritos.

A detecção inicial de fagos mutantes foi feita com os iniciadores D3 e D4 (Tab.3) desenhados no programa DNASTrider (jonas.saclay.cea.fr). O programa de PCR foi constituído de: um ciclo 5 min. a 95°C, 30 ciclos (30 seg. 95°C, 30 seg. 59°C, 2 min. 72°C) e 10 min a 72°C (Applied Biosystems 2720 thermal cicler, USA). O produto da PCR de fagos mutantes, correspondente a 1677pb para *Hsp-eGFP* e 1262pb para *eGFP* foi revelado com brometo de etídio após eletroforese de DNA em gel de agarose 0,8% (GEHealthcare, EUA).

Os iniciadores D5 e D6, utilizados para amplificar exclusivamente fagos contendo o inserto, foram desenhados de maneira que a fita sense hibridiza com o DNA do D29, enquanto que o antisense hibridiza no gene *eGFP*. A amplificação foi efetuada com a enzima PFU (Stratagene, USA). O programa da PCR foi constituído de: um ciclo 5 min. a 95°C, 25 ciclos (30 seg. 95°C, 30 seg. 57°C, 30 seg. 72°C) e 5 min a 72°C (Applied Biosystems 2720 thermal cycler, USA). O produto da PCR de 429pb foi revelado com brometo de etídio após eletroforese de DNA em gel de agarose 1% (GEHealthcare, EUA).

3.9. Deleção do gene LysA do fago D29

O gene LysA foi deletado do micobacteriófago seguindo o mesmo procedimento anteriormente descrito. O fragmento de 100pb (F2) e os iniciadores D29 LysA-1 e D29 LysA-2 de 25pb com caldas de 75pb foram desenhados no programa Primer Premier 5.0 (Biosoft, Palo Alto, CA, EUA) (Tab. 4). O programa da PCR para amplificação dos produtos foi constituído de: um ciclo de 5 min a 95°C, 25 ciclos (30 seg. a 95°C, 30 seg. a 58°C, 1 min. a 72°C) e 10 min a 72°C.

3.9.1. Identificação de recombinantes

a) Pela PCR

A identificação de recombinantes pela PCR foi efetuada com os iniciadores D7 e D8, os quais hibridizam fora da região de recombinação (Tab. 4). A amplificação foi

efetuada com a enzima PFU. O programa de PCR foi constituído de: 5 min a 95°C, 30 ciclos (30 seg. a 95°C, 30 seg. a 59°C, 1min. 72°C) e 10 min a 72°C. Adicionalmente, o iniciador D9 (Tab.4), o qual hibridiza apenas com o DNA do fago mutante, foi utilizado com o iniciador D8 para aumentar a probabilidade de detecção, uma vez que, o gene *LysA* é importante para o desenvolvimento do fago. O programa de PCR foi constituído de: 5 min a 95°C, 30 ciclos (30 seg. a 95°C, 30 seg. a 59°C) e 10 min a 72°C. A amplificação foi feita com a enzima Platinum *Taq* (Applied biosystems, Foster City, CA, EUA) (Van Kessel et al., 2008).

b) Seleção fenotípica

Para seleção fenotípica, o plasmideo pNIT, o qual expressa o gene *LysA* do micobacteriófago Corndog, foi utilizado. Este plasmideo foi cedido pelo professor Graham Hatfull da Universidade de Pittsburgh, PA, EUA.

Um volume de 100µl de *M. smegmatis* mc² 155 ou *M. smegmatis* mc² 155:pNIT a 10⁷ UFC/ml foi inoculado em 4,9ml de meio 7H9 com 10% de ADC, 1mM de CaCl₂ e 0,75% de ágar. Canamicina a 30 µg/ml foi adicionada ao meio contendo *M. smegmatis* mc² 155:pNIT no momento do uso. O meio foi homogeneizado e distribuído em placas de Petri de 90mm contendo ágar 7H10. Cada placa foi subdividida em 100 quadrículos (Marinelli et al., 2008).

Tab 4. Iniciadores utilizados para deleção do gene *LysA*.

Iniciador/Inserito	Sequência
F2	5'-CATGACGCTCATAGTCACACGCGACCACGCGCAGTGGGTCCACGACATGAACCCC GAGTACCTACAGGCGTACATCGCCAGGAATGGAGCCCTATGA G- 3'
LysA-1	5'-GCAGGTTCGAGTCCTGCTCTCGCGACTTGACAGCCACCACGAAAGGAACCCATGAC GTCATAGTCACACGCGA-3'
LysA-2	5'- TGCCGGGGACGAGAGTGCCGACGTAGTAGAGCGTTTCACGGATCTTGGGGCTCAT AGGGCTCCATTCTGGCGAT-3'
D7	5'-GTTCGAGTCCTGCTCTCGCGA-3'
D8	5'-ACGAGAGTGCCGACGTAGTAGA-3'
D9	5'-GCAGTGGGTCCACGACATGAAC-3'

Uma pequena amostra de cada halo de inibição foi inoculada primeiramente em um quadrículo na placa contendo *M. smegmatis* mc² 155 e, em seguida, na placa com *M. smegmatis* mc² 155:pNIT. Cerca de 100 amostras foram inoculadas em cada placa.

As placas foram incubadas por 24h/37°C. Bacteriófagos que produziram halos de inibição exclusivamente na placa contendo *M. smegmatis* mc² 155:pNIT foram considerados mutantes.

4.0 Avaliação da expressão da eGFP.

Em um volume de 4,5 ml de meio 7H9 com 10% de ADC e 1mM de CaCl₂ foi inoculado com 0,5ml de *M. smegmatis* mc²155. O meio foi mantido por 24h/37°C. Aliquotas de 250 µl da cultura foram distribuídas em tubos de 1,5 ml. Os tubos foram

subdivididos em 4 grupos: G1, G2, G3, G4, G5 e G6. Os dois primeiros grupos foram infectados com 1µl de micobacteriófago a 10^8 PFU/ml. Os demais grupos foram infectados com 10 µl de micobacteriófagos, na mesma concentração dos grupos G1 e G2. Os grupos G1 e G3 foram incubados por 6h/30°C. Uma amostra de 250 µl foi recolhida a cada 30 min. e 250µl de formaldeído a 4% gelado foi adicionado. As amostras foram armazenadas em geladeira até o momento da análise. O mesmo procedimento foi efetuado com os grupos G2 e G4, que foram incubados por 6h/37°C. Os grupos G5 e G6 foram os controles negativos para as temperaturas de 30°C e 37°C, respectivamente.

5.0 Resultado e discussão

5.1. Análise do genoma do D29 para inserção da eGFP e Hsp60-eGFP.

Como objetivo de identificar uma região onde o inserto pudesse ser inserido sem alterar a expressão de genes o genoma do D29 foi analisado. Apesar de ser um fago lítico, o D29 apresenta genes e regiões características de fagos lisogênicos. Os genes 71 e 72 presentes no micobacteriófago L5 encontram-se parcialmente deletados no genoma do D29. O gene 71 é responsável pela manutenção da lisogenia no L5 e, portanto, não é funcional no D29. Esta região, situada na porção final do braço direito do genoma do D29 foi escolhida para clonagem do inserto. A escolha dessa região aumentou a possibilidade de produzir um micobacteriófago sem perda de genes que podem ser essenciais para a produção de fagos dentro de micobactérias (Ford et al., 1998).

Trabalho anterior que introduziu genes no D29 demonstrou que, para haver uma boa expressão, o inserto clonado na porção final do braço direito do D29 deveria manter a mesma direção de leitura dos genes do fago. Ou seja, da direita para a esquerda (Pearson et al., 1996).

Portanto, o cassete *Hsp65-eGFP* foi amplificado de maneira a ser inserido no DNA genômico no mesmo sentido dos genes situados no braço direito do fago D29.

Além da inserção do cassete *Hsp-eGFP*, apenas a sequência codificadora da eGFP também foi inserida na mesma posição do cassete, uma vez que, existe a possibilidade de um promotor forte dirigir a transcrição de vários genes na região escolhida

5.2. Deleção do gene 71 e 72 do D29.

Os genes 71 e 72 do D29 foram deletados para confirmar se estão inativos ou que não são essenciais ao D29. Cerca de 100 halos de inibição (Fig. 9) foram coletados das placas de cultura e transferidos para tubos de 1,5 ml contendo 100 µl de tampão de fago. Halos que continham micobacteriófagos mutantes foram identificados pela PCR (Fig. 10) e purificados (Fig. 11).

Os bacteriófagos mutantes não apresentaram alterações morfológicas quanto à forma dos halos de inibição e quanto à infecção e produção de bacteriófagos.

Para observar se a mesma quantidade de DNA mutante poderia produzir a mesma quantidade de bacteriófagos que o DNA selvagem após eletroporação, 2 µl de

DNA mutante ou selvagem, contendo 100 ng/ μ l de DNA foram eletroporados em células de *M. smegmatis* mc² 155 eletrocompetentes.

Fig. 9. Halos de inibição formados após eletroporação de DNA de D29 e o inserto de 200 pb em células de *M. smegmatis* mc² 155:pJV53.

A produção de bacteriófagos nas placas após incubação por 24h/37°C foi semelhante. O fago recombinante também não sofreu alterações na morfologia dos halos formados. Estes dados, juntamente com a análise do genoma do D29 e os resultados previamente obtidos da literatura foram considerados suficientes para prosseguir com os estudos e inserir o gene da eGFP com e sem o promotor no D29.

Fig. 10. Produto da PCR dos halos de inibição formados após infecção de *M. smegmatis* mc² 155. Eletreforesse em gel de agarose 1%/100V/60mA 1. Padrão de 1 kb, 2-16. PCR dos halos de inibição. Fragmento correspondente a 901pb corresponde à presença de fago selvagem. O fragmento de 529pb caracterizam a presença de fago mutante.

Fig. 11. Produto da PCR dos halos de inibição de fagos purificados. Eletreforesse em gel de agarose 1%/100V/60mA 1. Padrão de 1 kb, 2. Dna de D29 selvagem. 3. DNA de D29 selvagem e recombinante. 4-12. PCR de DNA de D29 purificados. 901pb: presença de fago selvagem. 529pb: fago mutante.

5.3. Amplificação, eletroporação dos insertos *Hsp-eGFP*, *eGFP* e purificação de fagos mutantes.

O inserto *Hsp-eGFP* e *eGFP* foram amplificados do plasmídio pYL 37-*eGFP* (Piuri et al., 2009) com o produto final apresentando 100pb de homologia ao DNA do

D29 em ambos os lados (Fig. 12) O resultado da eletroporação mostrou-se menos eficiente quando comparado com a inserção dos 200 pb, a qual confirmou que a região não era essencial para o D29.

Micobacteriófagos contendo o gene *eGFP* em plaqueamento primário foram detectados em uma única amostra de 100 halos analisados pela PCR (Fig. 13). A obtenção de fagos recombinantes puros no plaqueamento secundário não foi possível.

Fig. 12. Produtos da PCR resultantes da amplificação do cassette *Hsp-eGFP* e *eGFP* com 100pb em ambos os lados homólogos ao D29. Eletroforese em gel de agarose 1%/100V/60mA 1. Padrão de 100pb, 2. *eGFP*, 3. *Hsp-eGFP*.

Fig. 13. Eletroforese em gel de agarose 1%/100V/60mA da PCR dos halos de inibição primários. Identificação de fagos mutantes contendo o gene da eGFP. 1. Padrão de 100pb, 17. Fragmento de 257pb de D29 mutante, 2-16 e 18-19. PCR de halos sem fago mutante, 20. D29 não mutante, controle negativo.

Para recombinação do inserto *Hsp60-eGFP*, foram necessárias 4 eletroporações. A PCR utilizando iniciadores que flanqueiam o inserto não detectou fagos mutantes no plaqueamento primário. Estes iniciadores foram posteriormente utilizados apenas para confirmar a presença de fagos recombinantes já purificados.

Iniciadores que amplificam exclusivamente bacteriófagos recombinantes foram utilizados para detecção de mutantes no plaqueamento primário. Neste caso, o iniciador sense foi desenhado para hibridizar no DNA do D29, fora do inserto, enquanto o iniciador antisense foi desenhado de forma a hibridizar no promotor *Hsp65*. Fagos contendo *Hsp65-eGFP* foram detectados pela PCR em 7 halos de um total de 400 halos avaliados (Fig. 14). Apenas o halo que apresentou a banda de DNA mais intensa de no gel de agarose, correspondente ao recombinante, foi utilizado para obtenção de fagos recombinantes puros.

A quantidade de fago mutante dentro do halo de inibição foi bastante reduzida. Este fato foi observado após sucessivas diluições seriadas e plaqueamentos para obtenção de novos halos contendo apenas fago mutante (Fig. 15). O inserto foi

sequeenciado a fim de confirmar a presença do promotor e do *eGFP* dentro do micobacteriófago. Alterações no gene e promotor clonados, tais como mutações e deleções não foram observadas após sucessivos sequenciamentos, principalmente durante a produção de novos estoques, demonstrando uma boa estabilidade.

Fig. 14. Eletroforese em gel de agarose 1%/100V/60mA da PCR dos halos de inibição primários. Identificação de fagos mutantes contendo o *HSP-eGFP*. Amplificação com iniciadores que hibridizam apenas com D29 recombinante. 1. Padrão de 100pb, 2-20. halos primários. banda de 436pb indica presença de fagos recombinantes.

5.4 Expressão da *eGFP*.

A expressão da *eGFP* foi avaliada em um período de 6 horas nas temperaturas de 30°C, 37°C, 42°C. A expressão em diferentes temperaturas foi efetuada a fim de verificar se a fluorescência das bactérias era aumentada ou diminuída. Foi detectada a presença de bactérias fluorescentes em 2 h de incubação, em ambas as temperaturas estudadas. Entretanto, as amostras de 2 h de incubação, apresentaram uma quantidade de bactérias bastante reduzida, indicando lise celular.

Apesar da lise celular e da dificuldade de encontrar células viáveis (2 a 3 por campo), uma pequena quantidade de micobactérias fluorescentes foram detectadas no

período de 2h. Entretanto, nas amostras obtidas de 3h até 6h, não foi observada células fluorescentes entre o pequeno número de bactérias viáveis encontradas (Fig. 16).

Fig. 15. PCR dos halos de inibição após sucessivas diluições e plaqueamento. Eletroforese em gel de agarose 1%/100V/60mA, revelação com brometo de etídio 1. Padrão de 100pb, 2-5. Fagos recombinantes purificados (amplificação com iniciadores que hibridizam apenas com D29 recombinante), 6. DNA Fago D29 selvagem, 7. Padrão 1Kb, 8-11. Fagos recombinantes (amplificação com iniciadores que flanqueiam o inserto), 12 DNA Fago D29 selvagem.

5.4. Expressão da eGFP.

O grande número de células mortas lisadas e o pequeno número de células viáveis fluorescentes (Fig. 16) são característicos da rápida lise celular causada pelo fago D29, o qual provoca a lise celular em cerca de 90 minutos (Rybniker et al., 2006). o *LysA*, principal gene envolvido na lise celular, foi deletado, com o intuito de aumentar o período de latência do bacteriófago.

5.5 Deleção do gene *LysA*

A deleção do gene *LysA* foi efetuada. Um total de três eletroporações para recombinação foi efetuado e a detecção de recombinantes pela PCR foi feita em halos primários (Fig. 17). Entretanto, fagos recombinantes não foram detectados em 400 halos de inibição secundários analisados pela PCR. Estes dados sugerem que a deleção total do gene *LysA* no micobacteriófago D29 não permite a sobrevivência do fago recombinante ainda que outros genes relacionados com a lise celular estejam funcionando adequadamente. O gene é, portanto, essencial.

Uma segunda tentativa de isolamento do fago selvagem foi realizada com o ensaio fenotípico. Neste ensaio, uma amostra de cada halo de inibição foi inoculada em duas placas de Petri, sendo uma contendo *M. smegmatis* mc² 155 e outra contendo *M. smegmatis* mc² 155::pNIT, o qual contém o *LysA* do micobacteriófago Corndog. Um total de 1300 halos de inibição secundários foram analisados, mas a presença de fago recombinante não foi detectada (Fig.18).

Fig. 16. Expressão da eGFP em micobactérias infectadas com micobacteriófago recombinante. A. Células lisadas – 2h de contato com fago D29 recombinante. B. Célula lisada com expressão de eGFP – 2h de contato com fago recombinante. C. Grande quantidade de células lisadas após 4 h de contato com fago recombinante. D. Micobactérias expressando eGFP - 2h de infecção. A e D, fotografia em campo claro. B e C, fotografia de fluorescência.

Fig. 17. PCR dos halos de inibição para detecção de fago deficiente do gene LysA. Eletroforese em gel de agarose 1%/100V/60mA, revelação com brometo de etídio 1. Padrão de 100pb, 2. DNA de D29, 3-8 e 10-14 halos negativos. 9 e 15. Halos positivos.

Fig. 18. Ensaio fenotípico para detecção de fagos mutantes para o gene LysA. A. Fagos inoculados placa contendo *M. smegmatis* mc²155. B. Fagos inoculados em placas contendo *M. smegmatis* mc² 155::pNIT.

6. Conclusões

Os genes 71 e 72 não são essenciais para a replicação do micobacteriófago D29 em *Mycobacterium smegmatis* mc²155, pois a deleção destes genes manteve o fago mutante com todas as características do D29 selvagem.

A inserção do cassete *Hsp-eGFP* no D29 foi obtida, o bacteriófago recombinante foi purificado e está expressando adequadamente a eGFP.

A quantidade de eGFP produzida em 2 h não é suficiente para visualização adequada em microscópio de fluorescência. A rápida lise de micobactérias infectadas pelo fago D29 não permitiu uma concentração adequada de eGFP no interior das células.

Não foi possível o isolamento, para posteriores estudos, de bacteriófagos com o gene *LysA* deletado, apesar de terem sido detectados na PCR. No ensaio fenotípico não foram identificados fagos recombinantes isolados, sugerindo que a recombinação nesta região foi baixa ou que fagos recombinantes estavam sempre associados aos fagos selvagens.

Apesar de não ter a importância do gene *LysA* na lise celular, o gene *LysB* poderá ser deletado com o intuito de contribuir para aumento da latência do fago. Ainda, a deleção de pequenos fragmentos da região promotora do gene *LysA* poderá reduzir a atividade deste gene e contribuir para uma melhor visualização da *eGFP* dentro da célula.

Referencias

Armand, S.; Vanhuls, P.; Delcroix, G.; Courcol, R.; Lemaître, N. Comparison of the Xpert MTB/RIF Test with an IS6110-TaqMan Real-Time PCR Assay for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory and Nonrespiratory Specimens. **J. Clin. Microbiol.** v. 49(5), 1772-1776, 2011.

Ajbani, K.; Shetty, A.; Mehta, A.; Rodrigues, C. Rapid diagnosis of extensively drug-resistant tuberculosis by use of a reverse line blot hybridization assay. **J. Clin. Microbiol.** v. 49(7), 2546-51, 2011.

Albay, A.; Kisa, O.; Baylan, O.; Doganci, L. The evaluation of FAST Plaque TB test for the rapid diagnosis of tuberculosis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 46(3), p. 211-215, 2003.

Bai, H.; Sun, M.; Ghosh, P.; Hatfull, G.F.; Grindley, N. D.; Marko, J. F. Single-molecule analysis reveals the molecular bearing mechanism of DNA strand exchange by a serine recombinase. **PNAS.** 108(42), 2011.

Bang, H.; Park, S.; Hwang, J.; Jin, H.; Cho, E.; Kim, D. Y.; Song, T.; Shamputa, I. C.; Via, L. E.; Barry, C. E III, Cho, S. N.; Lee, H. Improved rapid molecular diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis using a new reverse hybridization assay, REBA MTB-MDR. **J. Med. Microbiol.** 2011.

Barman, P.; Gadre, D. A study of phage based diagnostic technique for tuberculosis. **Indian J. Tuberc.**, v. 54(1), p. 36-40, 2007.

Bardarov, S.; Bardarov, S. Jr.; Pavelka, M. S. Jr.; Sambandamurthy V.; Larsen, M.; Tufariello, J.; Chan, J.; Hatfull, G.; Jacobs, W. R. Jr. Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*BCG and *M. smegmatis*. **Microbiology**,v. 148, p. 3007-3017, 2002.

Banaiee, N.; January, V.; Barthus C.; Lambrick, M.; Roditi, D.; Behr, M. A.; William, R. J. Jr.; Steyn, L. M. Evaluation of a semi-automated reporter phage essay for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in South Africa. **Tuberculosis**, v. 88 (1), p. 64-68, 2008.

Biswas, D.; Deb, A.; Gupta, P.; Prasad, R.; Negi, K. S. Evaluation of the usefulness of phage amplification technology in the diagnosis of patients with paucibacillary tuberculosis. **Indian J. Med. Microbiol.** v.26(1), p. 75-78, 2008.

Boehme, C. C.; Nabeta, P.; Hillemann, D.; Nicol, M. P.; Shenai, S.; Krapp, F.; Allen, J.; Tahirli, R.; Blakemore, R.; Rustomjee, R.; Milovic, A.; Jones, M.; O'Brien, S.M.; Persing, D. H.; Ruesch-Gerdes, S.; Gotuzzo, E.; Rodrigues, C.; Alland, D.; Perkins, M. D. Rapid molecular detection of Tuberculosis and Rifampin resistance. **N. Engl. J. Med.** 362, 1005-15, 2010.

Bonnet, M.; Ramsay, A.; Githui, W.; Gagnidze, L.; Varaine, F.; Guerin, P. J. Bleach Sedimentation: An Opportunity to Optimize Smear Microscopy for Tuberculosis Diagnosis in Settings of High Prevalence of HIV. **Clin. Infect. Dis.** 26(11), 1710-16, 2008.

Broxmeyer, L.; Sosnowska, D.; Miltner, E.; Chaco'n, O.; Wagner D.; McGarvey, J.; Barletta, R. G.; Bermudez, L. E. Killing of Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis by a Mycobacteriophage Delivered by a Nonvirulent Mycobacterium: A Model for Phage Therapy of Intracellular Bacterial Pathogens. **J. infect. Dis.** 186, 1155-60, 2002.

Burrowes, B.; Harper, D. R.; Anderson, J.; McConville, M.; Enright, M. C. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.** 9(9), 775-85, 2011.

Capparelli, R.; Parlato, M.; Borriello, G.; Salvatore, P.; Lannelli, D. Experimental Phage Therapy against Staphylococcus aureus in Mice. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.51(8), p. 2765-2773, 2007

Cattamanchi, A.; Dowdy, D. W.; Davis, J. L.; Worodria, W.; Yoo, S.; Joloba, M.; Matovu, J.; Hopewell, P.; Huang, L. Sensitivity of direct versus concentrated sputum smear microscopy in HIV-infected patients suspected of having pulmonary tuberculosis. **BMC Infect. Dis.** 9(1): 53, 2009.

Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Praser, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802- 805, 1994.

Changsen, C.; Franzblau, S. G.; Palittapongarnpim, P. Improved green fluorescent protein reporter gene based microplate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 3682-3687, 2003.

Cox, H. S.; Morrow, M.; Deutschmann, P. W. Long term efficacy of DOTS regimens for tuberculosis: systematic review. **BMJ**, v. 336, p. 484-487, 2008.

Cruciani, M.; Scarpo, C.; Malena, M.; Bosco, O.; Serpelloni, G.; Mengoli, C. Meta-analysis of Bactec MGIT 960 and Bactec 460 TB, with or without solid media, for detection of Mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.** 42(5), p. 2321-25, 2004.

Danelishvili, L.; Young, L.S.; Bermudez, L.E. In vivo efficacy of phage therapy for Mycobacterium avium infection as delivered by a nonvirulent mycobacterium. **Microb. Drug. Resist.** 12(1), 1-6, 2006.

Dusthacker, A.; Kumar, V.; Subbian, S.; Sivaramakrishnan, G.; Zhu, Subramanyam, G.; Hassan, S.; Nagamaiah, S.; Chan, J.; Rama N. P. Construction and evaluation of luciferase reporter phages for the detection of active and non-replicating tubercle bacilli. **J Microbiol Methods.** v. 73(1), 18-25, 2008.

Dinakaran, M.; Senthilkumar, P.; Yogeewaru.; China, A.; Nagaraja, V.; Sriram, D. Novel ofloxacin derivatives: synthesis, antimycobacterial and toxicological evaluation. **Bioorganism and Medicinal Letters**, v. 18 (3), p. 1229-1236, 2008.

Dphil, C. D.; Bassili, A.; Bierrenbach A. L.; Broekmans, J. F.; Chadha, V. K.; Glaziou, P.; Gopi, P. G.; Hosseini, M.; Kim S. J.; Manissero, D.; Onozaki, I.; Rieder, H. L.; Scheele, S.; Van Leth, F.; Van Der Werf, M.; Williams B. G. Measuring tuberculosis: burden, trends, and the impact of control programmes. **The lancet infectious diseases**, v. 8 (4), p. 233-243, 2008.

Ford, M. E.; Sarkis, G. J Belanger, A. E.; Hendrix, R.W.; Hatfull G. F Genome Structure of Mycobacteriophage D29:Implications for Phage Evolution. **J. Mol. Biol.**279, 143-64, 1998.

Freire-Moran, L.; Aronsson, B.; Manz, C.; Gyssens, I. C.; So, A. D.; Monnet, D. L.; Cars, O. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria – Time to react now. **Drug Res. Updates.** 14, 118-124, 2011.

Hanlon, G. W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **Int. J. Ant. Agents.**, 30, 118-128, 2007.

Husson, R. N.; James, B.E.; Young, R. A. Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria. **J. Bacteriol.** v.172: (2), 519-24, 1990.

Huang, J.; Ghosh, P.; Hatfull, G.F.; Hong, Y. Successive and targeted DNA integrations in the Drosophila genome by Bxb1 and fC31 integrase. **Genetics.** v. 189, p.391-395, 2011.

Hsiao, C.H.; Lin, Y. T.; Lai, C.C.; Chou, C. H.; Hsueh, P. R. Identification of nontuberculous mycobacterial infection by IS6110 and hsp65 gene analysis on lung tissues. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 68(3), p.241-6, 2010.

Ige, O. M.; Akindele, M. O. Five year review of treatment outcome of directly observed therapy (DOT) for re-treatment pulmonary tuberculosis patients in UCH, Lbadan, Nigeria. **Afr. J. Med. Sci.** 40(1), 15-21, 2011.

Jacobs Jr, W. R.; Barletta, R.G.; Udani, R.; Chan, J.; Kalkut, G.; Sosne, G.; Kieser, T.; Sarkis, G. J.; Hatfull, G. F.; Bloom, B. R. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. **Science**. 260: 819–822, 1993.

Jacobs Jr, W. R.; Tuckman, M.; Blomm, B. R. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid. **Nature**. 327, p.532-535, 1987.

Joseph, J.; Rajendran, V.; Hassan, S.; Kumar, V. Mycobacteriophage genome database. **Bioinformation**. 6(10), p. 393-94, 2011.

Joshi, R.; Patil, S.; Kalantri.; Schwartzman, K.; Menzies, K.; Pai. M.; Prevalence of abnormal radiological findings in health care workers with latent tuberculosis infection and correlations with T cell immune response. **Plos One**, v. 2 (8), e805, 2007.

Kahla, B. I.; Ben S.W.; Marzouk, M.; Ferjeni, A.; A, Ghezal, S.; Boukadida, J. Evaluation of a simplified IS6110 PCR for the rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in an area with high tuberculosis incidence. **Pathol Biol (Paris)**. v. 59(3), p. 161-5, 2011.

Katoch, V.M.; Parashar, D. D.S.; Singh, V. M.; Sharma, V.D.; Ghosh, S. Rapid identification of mycobacteria by gene amplification restriction analysis technique targeting 16S - 23S ribosomal RNA internal transcribed spacer & flanking region. **Indian J. Med. Res.** v. 125, p.155-162.

Kumar, V.; Balaji, S.; Gomathi, N. S.; Venkatesan, P.; Sekar, G.; Jayasankar, K.; Narayanan, P. R. Phage cocktail to control the exponential growth of normal flora in processed sputum specimens grown overnight in liquid medium for rapid TB diagnosis. **J. Mic. Methods**. v. 68(3), p. 2030-2043, 2007.

Kumar, V.; Loganathan, P.; Sivaramakrishnan, G.; Kriakov, J.; Dusthakeer, A.; Subramanyam, B.; Chan, J.; Jacobs WR Jr, Paranjitha Rama N. Characterization of

temperate phage Che12 and construction of a new tool for diagnosis of tuberculosis. **Tuberculosis**. 88, 616–623, 2008.

Lucke, K.; Hombach, M.; Friedel, U.; Ritter, C.; Böttger, E. C. Automated quantitative drug susceptibility testing of non-tuberculous mycobacteria using MGIT 960/EpiCenter TB eXiST. **J. Antimicrob. Chemother.** 6(11), p.1-5, 2011.

Larsen, M.H.; Biermann, K.; Tandberg, S.; Hsu, T.; Jacobs, W.R. Jr. Genetic Manipulation of Mycobacterium tuberculosis. **Curr. Protoc. Microbiol.** v. 10, 10 A.2, 2007.

Marx, C. J. Development of a broad-host-range sacB-based vector for unmarked allelic exchange. **BMC res Notes**. v.1(1), p.1-8, 2009.

Marinelli, L. J.; Piuri, M.; Swigonova, Z.; Balachandran, A.; Oldfield, L. M.; Van Kessel, J. C.; Hatfull, G. F. BRED: A simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *Plos one*. 3(12), e3957, 2008.

McVay, C. S.; Velasquez, M.; Fralick, J. A. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* in mouse burn wound model. **Antimicrob. Agents Chemoter.** 51(6); 1934-38, 2007.

Medjahed, H.; Reytrat, J.M. Construction of *Mycobacterium abscessus* defined glycopeptidolipid mutants: comparison of genetic tools. **Appl Environ Microbiol.** v.75(5), p1331-8, 2008.

Merril, C.R.; Biswas, B.; Carlton, R.; Jensen, N.C.; Creed, G.J.; Zullo, S.; Adhya, S. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93(8), p. 3188-92, 1996.

Mfinanga, G. S.; Ngadaya, E.; Mtandu, R.; Mutayoba, B.; Basra, D.; Kimaro, G.; Chonde, T. M.; Ngowi, P.; Mfaume, S.; Kilale, A. M.; Egwaga, S.; Kitua, A. Y. The quality of sputum smear microscopy diagnosis of pulmonary tuberculosis in Dar es Salaam, Tanzania. **Tan. Health Res. Bull.** v. 9(3), p.164-168, 2007.

Miyata, M.; Pavan, F. R.; Sato, D. N.; Marino, L. B.; Hirata, M. H.; Cardoso, R. F.; deMelo, F. A.; Zanelli, C. F.; Leite, C. Q. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Brazil: Phenotypic and genotypic methods. **Biomed. Pharmacother.** [Epub ahead of print], 2011.

Ministério da Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias. Brasília, Distrito Federal. 436 p. 2008

Nascimento, I. P.; Dias, W. O.; Quintilio, W., Hsu, T.; Jacobs, W. R. Jr., 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(52), p.7346-351, 2009.

Negi, S. S.; Anand, R.; Pasha, S. T.; Gupta, S.; Basir, S. F.; Khare, S.; Lal, S. Diagnostic potential of IS6110, 38KDA, 65KDA and 85B sequence-based polymerase chain reaction in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* clinical samples. **IJMM**. v. (25), p. 43-9, 2007.

Neonakis, I. K.; Gitti, Z.; Krambovitis, E.; Spandidos, D. A. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. **J. Microbiol. Methods**. 75, p. 1-11, 2008.

Pearson, R. E.; Jurgensen, S.; Sarkis, G. J.; Hatfull, G. F.; Jacobs Jr, W. R. Construction of D29 shuttle plasmids and luciferase reporter phages for detection of mycobacteria. **Gene**. 183, 129-36, 1996.

Poroca, D. R.; Lima A. S.; Lima, J. F. A.; Cruz, H. L. A.; Montenegro, R. A.; Melo, F. L.; Schindler, H. C.; Montenegro, L. M. L. Differentiation of mycobacteria by multiplex PCR. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v. 42(6), 2009.

Piuri, M.; Jacobs Jr, W. R.; Hatfull, G. F. Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. v. 4(3), p. e4870, 2009.

Randon, L.; Piuri, M.; Jacobs Jr, W. R.; de Waard, J.; Hatfull, G. F.; Takiffi, H. E. Evaluation of fluoromycobacteriophages for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol**. v.49(5), 1838-42, 2011.

Rodrigues, C. S.; Shenai, S. V.; Almeida, D. V. G.; Sadani, M. A.; Goyal, N.; Mehta, A. P. Use of bactec 460 TB system in the diagnosis of tuberculosis. **Indian J. Med. Microbiol**. v.25(1), p.32-36, 2007.

Roth, J. P.; Li, J. K.; Smee, D. F.; Morrey, J. D.; Barnard, D. L. A recombinant, infectious human parainfluenza virus type 3 expressing the enhanced green fluorescent protein for use in high-throughput antiviral assays. **Antiviral Res**. v.82(1), 12-21, 2009.

Rybníček, J.; Kramme, S.; Small, P. L. Host range of 14 mycobacteriophages in *Mycobacterium ulcerans* and seven other mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis* – application for identification and susceptibility testing. **J. Med. Microbiol**. 55, 37 -42, 2006.

Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Sarkis, G. J.; Jacobs Jr, W. R.; Hatfull, G. F. L5 luciferase reporter mycobacteriophages: a sensitive tool for the detection and assay of live mycobacteria. **Mol. Microbiol.** 15: 1055–1067, 1995.

Singh, S.; Saluja, T. P.; kaur, M.; Khilnani, G. C. Comparative evaluation of Fast Plaque assay with PCR and other conventional in vitro diagnostic mehdods for the early detection of pulmonary tuberculosis. **J. Clin. Lab. Analys.** 22, 367-374, 2008.

Steingart, K.; Henry, M.; Vivienne, Ng.; Hopewell, P. C.; Ramsay, A.; Cunningham, J.; Urbanczik, R.; Perkins, M.; Aziz, M. A.; Madhukar, P. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. **Lancet Infect. Dis.** v. 6(9), p. 570-581, 2006.

Subramanyam, B.; Dusthacker, A.; Rehman, F.; Sekar, G.; Sivaramakrishnan, G. N.; Kumar, V. An alternative sputum processing method using chitin for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. **W. J. Microbiol. Biotechnol.** v. 26(3), 523-526, 2010.

Subramanyam, B.; Kumar, V.; Perumal, V.; Nagamiah, S.; Phage Lysin to supplement phagebiotics to decontaminate processed sputum specimens. **Eur. J. Microbiol. Infect Dis.** 29(11), 1407-12, 2010.

Silva, J. L.; Hirata, R. D. C.; Hirata, M. H. Bacteriophage:laboratorial diagnosis and phage therapy. **Braz. J. Microbiol.** 40, 547-49, 2009.

Telenti, A.; Marchesi, F.; Balz, M.; Bally, F.; Bottger, E.C.; Bodmer, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J. Clin. Microbiol.** 31(2), p. 175-178, 1993.

Theron, G.; Peter, J.; Van Zyl-Smit, R.; Mishra, H.; Streicher, E.; Murray, S.; Dawson, R.; Whitelaw, A.; Hoelscher, M.; Sharma, S.; Pai, M.; Warren, R.; Dheda, K. Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 132-140, 2011.

Van Kessel, J. C.; Marinelli, L. J.; Hatfull, G. F. Recombineering mycobacteria and their phages. **Nat Rev Microbiol.** v.6 (11): 851-7. 2008. Van Kessel, J. C. & Hatfull, G. F. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Methods.** 4,147–152, 2007.

Van Kessel, J. C.; Marinelli, L. J.; Hatfull, G. F. Recombineering mycobacteria and their phages. **Nat. Rev. Microbiol.** 6(11), 851-857, 2008.

Van Kessel, J. C.; Hatfull, G. F. Mycobacterial recombineering. *Methods Mol. Biol.* 435, 203-15, 2008.

Van den Boogaard, J.; Lyimo, R.A.; Boeree, M. J.; Kibiki, G.S.; Aarnoutse, R.E.; Electronic monitoring of treatment adherence and validation of alternative adherence measures in tuberculosis patients: a pilot study. **WHO**. 89(9), 632-9, 2011.

Whelan, J. A.; Russel, N. B.; Whelan, M. A. A method for the absolute quantification of cDNA using real time PCR. *J. Immunol. Meth.* 278, 261-69, 2003.

Yamada-Noda, M.; Ohkusu, K.; Hata, H.; Shah, M. M.; Nhung, P. H.; Sun, X. S.; Hayashi, M.; Ezaki, T. Mycobacterium species identification – A new approach via dnaJ gene sequencing. **Sys. App. Microbiol.** 30, p. 453–462, 2007.

Zeka, A. N.; Tasbakan, S.; Cavusoglu, C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF Assay for the Rapid Diagnosis of Tuberculosis and detection of RIF-resistance in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens. **J. Clin. Microbiol.** Epub ahead of print, 2011.

Anexo 1. Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6599973/2 - Joás Lucas da Silva

Email:	joaslucas@usp.br
Data de Nascimento:	02/06/1979
Cédula de Identidade:	RG - 5124611 - PE
Local de Nascimento:	Estado de Pernambuco
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel - Universidade Federal de Pernambuco - Pernambuco - Brasil - 2002
Mestrado:	Mestre em Biotecnologia de Produtos Bioativos (1) - Universidade Federal de Pernambuco - Pernambuco - Brasil - 2005

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	31/07/2008
Início da Contagem de Prazo:	31/07/2008
Data Limite:	31/07/2012
Orientador Acadêmico:	Prof(a). Dr(a). Primavera Borelli Garcia - 31/07/2008 a 16/10/2008 E.Mail: borelli@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 17/10/2008 até o presente. E.Mail: mhhirata@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 31/07/2008
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 13/12/2010
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado em 31/07/2008 Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2011

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2011

Impresso em: 23/10/11 12:02:00

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6599973/2 - Joás Lucas da Silva

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-1/3	Seminários em Análises Clínicas II	11/08/2008	24/11/2008	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5709-4/2	Biologia Molecular em Análises Clínicas	01/09/2008	05/10/2008	75	5	93	A	N	Concluída
FBC5793-9/1	Tópicos em Análises Clínicas I	23/03/2009	05/07/2009	30	2	75	A	N	Concluída
FBA5728-2/9	Aprimoramento Didático	02/04/2009	29/04/2009	60	4	85	A	N	Concluída
MGT5762-1/1	Evolução Viral e Epidemiologia Molecular dos Vírus Causadores de Hepatites – HCV e HBV (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	22/04/2009	05/05/2009	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5770-2/1	Micobactérias não Pertencentes ao Complexo Mycobacterium tuberculosis	01/03/2010	21/03/2010	45	3	89	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20	20
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	20	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria MEC nº 2530, de 06.09.2002.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2011

Impresso em: 23/10/11 12:02:00

Anexo 2. Currilo Lattes

João Lucas da Silva

Possui graduação em Biomedicina pela Universidade Federal de Pernambuco (2001) e mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos pela Universidade Federal de Pernambuco (2005). Atualmente é prog. de aprimoramento em biologia molecular da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em micobacteriófagos, tuberculose e expressão gênica. Atua principalmente nos seguintes temas: Mycobacterium tuberculosis, qPCR-HRM, recombinação e biossegurança.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 30/09/2011

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/318548966446659>

**Certificado
pelo autor em
30/09/11**

[Rede de Colaboração](#)

[Diretório de grupos de pesquisa](#)

[SciELO - artigos em texto completo](#)

Dados pessoais

Nome João Lucas da Silva

Nome em citações bibliográficas SILVA, João Lucas da; Silva, Joas; Silva, Joas L. da; Silva, Joas L. Da

Sexo Masculino

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Av. Lineu Preste, 580
Butantã
05508-900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 88577645 Fax: (11) 30913660

Formação acadêmica/Titulação

- 2008** Doutorado em andamento em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 6).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Construção e avaliação de Micobacteriófago expressando um gene codificador de uma proteína fluorescente para detecção de Mycobacterium tuberculosis em escarro. *Orientador:* Mario H. Hirata.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
- 2003 - 2005** Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
Título: Cinética bactericida da beta-lapachona, isoniazida e um novo derivado hidrazídico frente ao Mycobacterium fortuitum e M. smegmatis. *Ano de Obtenção:* 2005.
Orientador: Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
- 1998 - 2001** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
Título: Avaliação bacteriológica de águas minerais comercializadas na cidade de Recife/PE.
Orientador: Glícia Maria Torres Calazans.

- 2006 - 2007** Advanced English/TOEFL course. (Carga horária: 800h).
International Academy of English.
- 2003 - 2005** Inglês.
SENAC Recife.
- 2002 - 2003** Extensão universitária em Química Orgânica. (Carga horária: 40h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
- 2001 - 2001** Extensão universitária em Bacteriologia Clínica. (Carga horária: 40h).
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.
- 2001 - 2001** Extensão universitária em Hematologia. (Carga horária: 60h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
- 1999 - 1999** Biossegurança. (Carga horária: 45h).
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ.

Atuação profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

- 2008 - Atual** Vínculo: Egiário, Enquadramento Funcional: Prog. de Aprimoramento em Biologia Molecular, Carga horária: 30

Atividades

- 2011 - 2013** Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
Projetos de pesquisa
Estudo do transcriptoma de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* em células gigantes multinucleadas ativadas por vitamina A e D utilizando sequenciamento total em alta performance
- 2010 - 2011** Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
Projetos de pesquisa
Triagem de mutações em genes relacionados com resistência aos quimioterápicos em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* pela PCR em tempo real com curva de dissociação de alta resolução
- 2008 - 2008** Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
Projetos de pesquisa
Construção e Avaliação do Micobacteriófago D29 com Expressão da Proteína Verde Fluorescente para Detecção Rápida de Bacilos da Tuberculose Pulmonar

San Diego State University, SDSU, Estados Unidos.

Vínculo institucional

- 2007 - 2007** Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Phage Therapy and Phage community in Wine, Carga horária: 40

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Vínculo institucional

- 2002 - 2002** Vínculo: Estudante, Enquadramento Funcional: Ensino, Carga horária: 20

Outras informações Apoio a aulas práticas da Disciplina Análise bacteriológica da Água

Vínculo institucional

2000 - 2000	Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Ensino
Outras informações	Colaborador assistente técnico das atividades práticas do tópico diarreia infecciosa no V Curso Internacional Sobre Doenças Tropicais do Governo do Japão.
Vínculo institucional	
2000 - 2000	Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Analista Clínico, Carga horária: 20
Outras informações	Estágio em Análises Clínicas de 240 horas no Hospital Barão de Lucena
Vínculo institucional	
2000 - 2000	Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Analista Clínico, Carga horária: 20
Outras informações	Estágio de 284 horas em Análises Clínicas no Hospital das Clínicas da UFPE
Laboratório Central do Estado de Pernambuco, LACEN, Brasil.	
Vínculo institucional	
2002 - 2002	Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Analista Clínico, Carga horária: 30
Outras informações	Estágio (330 horas) em Análises Clínicas com ênfase a bacteriologia (Tuberculose, Hanseníase, Meningite bacteriana, infecções gerais).
Vínculo institucional	
2001 - 2001	Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Analista Clínico, Carga horária: 30
Outras informações	Estágio de 524 horas em Análises Clínicas no Laboratório Central de Pernambuco (Bacteriologia, Parasitologia, Urinalises, Bioquímica, Imunologia).

Projetos de Pesquisa

2011 - 2013	Estudo do transcriptoma de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em células gigantes multinucleadas ativadas por vitamina A e D utilizando sequenciamento total em alta performance <i>Situação:</i> Em andamento; <i>Natureza:</i> Pesquisa. <i>Alunos envolvidos:</i> Graduação (1) / Mestrado acadêmico (1) / Doutorado (1) . <i>Integrantes:</i> Hirata - Integrante / Walkiria Souza - Integrante / Bastos, Gisele Medeiros - Integrante / MARIO HIROYUKI HIRATA - Coordenador / Gabriela Guimaraes - Integrante / Christian Probst - Integrante / Joás Lucas da Silva - Integrante.
2010 - 2011	Triagem de mutações em genes relacionados com resistência aos quimioterápicos em isolados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pela PCR em tempo real com curva de dissociação de alta resolução <i>Situação:</i> Em andamento; <i>Natureza:</i> Pesquisa. <i>Alunos envolvidos:</i> Mestrado acadêmico (1) / Doutorado (2) . <i>Integrantes:</i> Hirata, Rosario D.C. - Integrante / Bastos, Gisele Medeiros - Integrante / Hirata RDC - Coordenador / Joás Lucas da Silva - Integrante. <i>Financiador(es):</i> Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro..
2008 - 2008	Construção e Avaliação do <i>Mycobacteriófago</i> D29 com Expressão da Proteína Verde Fluorescente para Detecção Rápida de Bacilos da Tuberculose Pulmonar

Idiomas

- Inglês** Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
- Espanhol** Compreende Bem, Fala Pouco, Lê Bem, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

- 2002** Primeiro lugar na categoria de monografias de conclusão de curso no III Congresso de Graduação da Universidade Federal de Pernambuco, PROACAD-UFPE

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **doi>** Anacássia Fonseca Lima ; Livia Bandeira Costa ; SILVA, Joás Lucas da ; Maria Bernadete Sousa Maia ; XIMENES, EA . Interventions for wound healing among diabetic patients infected with Staphylococcus aureus: a systematic review . São Paulo Medical Journal (Impresso) **JCR**, v. 129, p. 165-170, 2011.
2. **doi>** Silva, Joas L. Da ; Hirata, Rosario D.C. ; Hirata, Mario H. . Bacteriophage: laboratorial diagnosis and phage therapy. Brazilian Journal of Microbiology (Impresso) **JCR**, v. 40, p. 547-549, 2009.
3. **doi>** Silva, Joas L da ; Mesquita, Amanda RC ; Ximenes, Eulalia A . In vitro synergic effect of -lapachone and isoniazid on the growth of Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium smegmatis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso) **JCR**, v. 104, p. 580-582, 2009.
4. **doi>** Willner, Dana ; Furlan, Mike ; Haynes, Matthew ; Schmieder, Robert ; Angly, Florent E ; SILVA, Joás Lucas da ; Tammedoni, Sassan ; Nosrat, Bahador ; Conrad, Douglas ; Rohwer, Forest ; Gold, Jeffrey A. . Metagenomic Analysis of Respiratory Tract DNA Viral Communities in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Individuals. Plos One **JCR**, v. 4, p. e7370, 2009.
5. GLICIA, ; FEITOSA NETO, Aníllório ; SILVA, Joás Lucas da ; MOURA, Geraldo Jorge Barbosa de . Avaliação da Qualidade da Água Potável em Escolas da Rede Pública em Recife-PE/Brasil. Higiene Alimentar, v. 20, p. 80-82, 2006.

Resumos publicados em anais de congressos

1. SILVA, Joás Lucas da ; XIMENES, EA . In vitro bacterial activity of -lapachone alone and in combination against Mycobacterium fortuitum. In: I Encontro Nacional da Tuberculose, 2004, Brasília, 2004.
2. SILVA, Joás Lucas da ; GLICIA, . Avaliação Bacteriológica de Águas Minerais Consumidas na Cidade do Recife-PE. In: I Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, 2002, João Pessoa. Anais do I Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, 2002. v. 1.

Apresentações de Trabalho

1. Silva, Joas ; Leite, GGS ; Bastos GM ; Freitas KV ; SHINOHARA, D. K. ; Miyata M ; Souza WA ; Leite CQF ; Hirata RDC ; Hirata MH . Mutations C531T and C526T in the rpoB gene of Mycobacterium tuberculosis are readily detectable by qPCR-High resolution melting using plasmid-based controls. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. Cristina Fajardo ; Bastos, Gisele Medeiros ; Silva, Joas ; Santos, J ; Hirata RDC ; Hirata, Mario H. . Comparação da eficácia de 3 métodos de descontaminação de DNA genômico e plasmidial em laboratório de Biologia Molecular. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. Cristina Fajardo ; Silva, Joas ; Bastos, Gisele Medeiros ; Kiyokawa, R ; Santos, J ; Mario H. Hirata . Custo benefício do uso do gel RED na coloração de DNA é superior ao Bromo de etídio. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. Souza WA ; Bastos, Gisele Medeiros ; Silva, Joas ; Rosario Dominguez Crespo Hirata ; Hirata, Mario H. . Expressão de Caspase 3 e Caspase 9 em células THP-1 diferenciadas e infectadas com isolados de Mycobacterium tuberculosis. 2010.

6. MONTIJO JVIM, MARQUES DAV, LOPES T, SILVA, JOAS L. Da, HIRATA MHT, MAZZOLA FO, GATO IWO, PESSOA JUNIOR A. HUMAN ADENOVIRUS SOROTYPE 5 (HAd-5) PARTITION STUDY IN AQUEOUS TWO PHASE MCELLAR SYSTEM. 2010. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
9. LUCAS BC; Silva, Joas L. Da; Hirata, Rosario D.C.; Hirata, Mario H. . Padronização da PCR em tempo real com curva de dissociação de alta resolução para detecção de mutações no gene rpoB relacionadas com resistência a rifampicina em isolados clínicos de M. tuberculosis. 2010. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
10. Silva, Joas L. da; Fiuri M; ACB Brito; Bastos GM; Souza WA; Hirata RDC; Hatfull GF; Hirata, Mario H. . Identificação e deleção de uma região do DNA do Micobacteriófago D29 para Inserção de genes que expressam proteínas fluorescentes pela técnica de recombinação em micobacteriófagos por eletroporação de DNA. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. Silva, Joas L. Da; Souza Walkiria de Araujo; Cristina Fajardo; Bastos, Gisele Medeiros; Rosario Dominguez Crespo Hirata; Hirata, Mario H. . Implantação e Manutenção de Um Laboratório de Biossegurança Nível 3 para Manuseio de Mycobacterium tuberculosis. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
12. SILVA, Joás Lucas da; XIMENES, EA. . In vitro bacterial activity of beta-lapachone alone and in combination against Mycobacterium fortuitum. 2004. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
13. SILVA, Joás Lucas da; XIMENES, EA. . Atividade antimicobacteriana da beta-lapachona. 2004. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
14. SILVA, Joás Lucas da; GLICIA, . Avaliação Bacteriológica de águas minerais consumidas na Cidade de Recife-PE. 2002. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
15. SILVA, Joás Lucas da. Plantas Medicinais. 2002. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Produção técnica

Demais tipos de produção técnica

1. Silva, Joas. Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
2. GLICIA, ; SILVA, Joás Lucas da. Análises Microbiológicas da Água. 2002. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
3. IRMAO, J. I.; SILVA, Joás Lucas da. Diarréia Parasitária. 2000. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Eventos

Participação em eventos

1. XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Analysis of aqueous two-phase polymer system in the extraction of adenovirus particles. 2010. (Simpósio).
2. IV Encontro Nacional da Tuberculose. Expressão de Caspase 3 e Caspase 8 e Caspase 9 em células THP-1 diferenciadas e infectadas com isolados de Mycobacterium tuberculosis. 2010. (Simpósio).
3. SIIUSP. Padronização da PCR em tempo real com curva de dissociação de alta resolução para detecção de mutações no gene rpoB relacionadas com resistência a rifampicina em isolados clínicos de M. tuberculosis. 2010. (Simpósio).
4. 25 Congresso Brasileiro de Microbiologia. Identificação e deleção de uma região do DNA do Micobacteriófago D29 para Inserção de genes que expressam proteínas fluorescentes pela técnica de recombinação em micobacteriófagos por eletroporação de DNA. 2009. (Congresso).
5. Congresso de Biossegurança. Implantação e Manutenção de Um Laboratório de Biossegurança Nível 3 para Manuseio de Mycobacterium tuberculosis. 2008. (Congresso).

Anexo 3. Artigos submetidos.

Plasmid-based controls to detect *rpob* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* by qPCR-HRM

Joas L Silva^{a *}, Gabriela GS Leite ^a, Gisele M Bastos ^a, Beatriz C Lucas ^a, Daniel K Shinohara^a, Joyce S Takinami ^a, Marcelo Miyata ^b, Cristina M Fajardo ^a, Andre D Luchessi ^a, Clarice QF Leite ^b, Rosario DC Hirata ^a, Mario H Hirata^a

Revista: Tuberculosis, Manuscript Number: TUBE-D-11-00155.