

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIA**

Nicole Menezes de Souza

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA SMTL-13, UMA
LECTINA SECRETADA DE *Mycobacterium tuberculosis*.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em biotecnologia e biociências.

Orientador:

Prof. Dr. André Báfica

Co-orientador:

Prof. Dr. Daniel Mansur

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte elaborada pela Biblioteca
da
Universidade Federal de Santa Catarina

S729a Souza, Nicole Menezes de

Avaliação da imunogenicidade da sMTL-13, uma lectina secretada de *Mycobacterium tuberculosis* [dissertação] / Nicole Menezes de Souza ; orientador, André Báfica. - Florianópolis, SC, 2012.

80 p.: il., graf., tabs.

Dissertação(mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. Lectinas. 4. Imunogenicidade. I. Báfica, André Luiz Barbosa. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

CDU 577.23

Nicole Menezes de Souza

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA SMTL-13, UMA
LECTINA SECRETADA DE *Mycobacterium tuberculosis*.**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Local, de de 2012

Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Oliveira Simões
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. André Báfica
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Fabrício Neves
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Oscar Bruna-Romero
Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico este trabalho aos meus três pilares de
sustentação: Aldo, Jane e Michele

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus orientadores: Ao Prof. André Báfica, por ter me dado oportunidade de amadurecer junto ao LIDI e por me ensinar a importância e a beleza da ciência por de trás dos métodos; Ao Prof. Daniel Mansur, por ter me auxiliado e guiado durante não somente os momentos de dúvida. Ambos foram importantes nas discussões sobre a ciência da vida.

Ao Prof. Edmundo pela disponibilidade de seu laboratório e reagentes para realização de diversos experimentos, mas principalmente pela atenção, conselhos e conversas.

Ao Dr. Juliano Bordignon ICC/FIOCRUZ, que sempre muito educado e atencioso, colaborou para obtenção de reagentes essenciais para o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Prof. Mário Steindel que, com toda sua sabedoria, educação e bom humor, tornou as idas ao MIP e as apresentações de seminários mais proveitosas e divertidas.

A todos os integrantes e ex-integrantes do LIDI, que fazem parte da minha segunda família e dividem ou dividiram comigo meu segundo lar. Todos possuem uma importância única e especial em minha vida.

Agradeço em especial à Verônica, por toda a ajuda, companheirismo, risadas e amizade verdadeira que me auxiliaram durante toda a dissertação, dentro e fora do LIDI, dando bronca quando necessário, contando piadas para me divertir e até me tirando do sedentarismo; ao Álvaro, por toda sua serenidade e conselhos extremamente importantes e que ajudaram a me tornar uma pessoa diferente e melhor durante esses anos; à Nika e à Puka, minhas “filhas”, por terem sempre me acompanhado e me ajudado da maneira mais carinhosa que uma “mãe” poderia imaginar; à Mariane, minha companheira de mestrado, de caminhada, de saídas repentinas, pela amizade, trabalho e risadas compartilhadas; e ao Lucas, por todas as conversas, científicas ou não, regadas a um bom café, pela confiança e amizade. Com a ajuda de vocês, esses anos de LIDI se tornaram anos inesquecíveis e incríveis, vocês ficarão para sempre comigo.

Aos integrantes dos laboratórios de Protozoologia, por terem me aguentado durante grande parte da dissertação, dividindo conversas, conhecimento e gerando grandes amizades.

Agradeço em especial à Patrícia, por ter me auxiliado, e muito, para a obtenção do protagonista da história contada a seguir; à Celina, por ter me ensinado muito sobre como a vida pode ser vista e vivida; à Elisa, por todas as suas histórias e por seu jeito cativante.

A todos os laboratórios do MIP, que de uma forma ou de outra tiveram sua contribuição para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus “velhos” amigos, que guardo um carinho muito grande, vocês tiveram um papel essencial nesta dissertação ao me distraírem e me entenderem quando muitas vezes meu assunto não ia além da dissertação.

Ao Ivan, que desde o início da minha entrada no LIDI estive ao meu lado, me apoiando, me confortando (quando achava que “tudo” estava perdido), aguentando os dias, noites, finais de semana e feriados que tive que passar no laboratório, sempre ajudando a transformar o que eu via como problemas, em casos facilmente solucionáveis, com sua calma e bom senso digno de um ser humano de caráter. Obrigada por sua essencial importância para a realização deste trabalho e por estar comigo.

Por último, e de forma alguma menos importante, à minha família, que sempre me apoiou e que formam os meus pilares de sustentação. Agradeço por ter me ensinado a ser a pessoa que sou hoje, por ser incrivelmente responsável pelo meu caráter, obrigada por estar sempre ao meu lado e por me dar apoio emocional, amor e carinho incondicional. Aldo, Jane e Michele, sem vocês, definitivamente, minha vida não teria graça alguma e eu não teria alcançado nenhuma conquista. Amo vocês!

“Faz-se sempre ciência e arte com emoção, isto é,
ao se fazer ciência e arte, move-se,
obrigatoriamente, dentro de um domínio de ação
determinado pela emoção.”

(Dr. Henrique Leonel Lenzi)

RESUMO

A tuberculose, causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), é uma doença responsável por aproximadamente 1,4 milhão de mortes anuais no mundo. Dado seu grande impacto na saúde pública, aliado à ausência de um modelo vacinal eficaz e ao surgimento de cepas resistentes, existe uma clara necessidade na busca por novos imunógenos, bem como novas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento da TB. Nosso grupo caracterizou um possível antígeno vacinal, a lectina de 13 kDa secretada pelo *Mtb* (sMTL-13), que apresentou alto potencial antigênico na indução de respostas imunes celulares (IFN- γ /PBMC) e humorais (IgG/soro) em pacientes com tuberculose ativa. A natureza ubíqua das lectinas reflete o seu envolvimento em diversos mecanismos celulares, tornando significativo o estudo da sua interação em processos biológicos. Visando obter informações acerca da imunogenicidade da sMTL-13, este trabalho demonstrou que, além de secretada, esta proteína possui capacidade de ficar ancorada na parede celular do *Mtb*, provavelmente pela sua sequência conhecida como peptídeo sinal, tendo uma possível função na interação inicial do bacilo com células apresentadoras de antígeno (APCs), pois a incubação do *Mtb* com a D-Galactose, carboidrato que possui afinidade pela sMTL-13, e não L-Galactose, foi capaz de impedir essa interação. Esta lectina também foi capaz de induzir produção de citocinas pró-inflamatórias por APCs e essas foram capazes de levar a uma proliferação celular de linfócitos T CD4+ antígenos-específicos, indicando que a sMTL-13 possui atividade imunogênica. Estes dados demonstram que há uma importante regulação na interação de proteínas ligantes de carboidratos com o APCs e que a sMTL-13 pode atuar como padrão molecular associado a patógenos (PAMP) do *Mtb*, porém há a necessidade de mais estudos envolvendo a interação dessa lectina com células do sistema imune.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, lectina, sMTL-13, D-galactose, imunogenicidade.

ABSTRACT

Tuberculosis, mainly caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), is responsible for approximately 1.4 million deaths worldwide. Given a high impact in public health caused by *Mtb*, inefficient vaccine models and emergence of *Mtb* resistant strains, there is a need for novel strategies involving immunogens, diagnosis and treatment against TB. Our group recently described a β -galactose-binding 13 kDa secreted lectin from *Mtb* (sMTL-13), which was found to induce cellular (IFN- γ /PBMC) and humoral (IgG/serum) immune responses in patients with active TB, being vaccine antigen candidate. The ubiquitous nature of lectins displays their role in several cellular mechanisms and studies involving their interaction in biological process become important. In order to obtain information about the immunogenicity of sMTL-13, this study demonstrated that sMTL-13, in addition to being secreted, was found at the *Mtb* cell wall, probably by the signal peptide sequence. Anchored sMTL-13 probably display a function in the initial interactions of *Mtb* and antigen presenting cells (APCs), since incubation of *Mtb* with D-Galactose, but not L-Galactose, was capable to prevent such interactions. This lectin was also able to induce TNF production by APCs as well as specific antigen T CD4 + lymphocyte proliferation, indicating that sMTL-13 display immunogenic activity. Our data suggest that carbohydrate-binding proteins play an important role for in *Mtb*-APC interactions the sMTL-13 can act as an *Mtb* pathogen-associated molecular pattern (PAMP). However, further studies involving the interaction of this lectin with immune cells are necessary.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, lectin, sMTL-13, D-galactose immunogenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Números de casos incidentes em 2010 de TB no mundo por 100.000 habitantes.....	26
Figura 2 - Esquema da parede celular micobacteriana.....	30
Figura 3 - Base celular da resposta do hospedeiro à TB.....	34
Figura 4 - Representação esquemática do vetor de expressão pET21a.....	48
Figura 5 - Esquema dos linfonodos drenantes coletados para obtenção de células CD4+.....	51
Figura 6 - sMTL-13 está presente na superfície celular de <i>Mtb</i>	57
Figura 7 - Avaliação da interação da D-Gal com a superfície do <i>Mtb</i>	59
Figura 8 - Aparência dos BMMs infectados e das UFCs.....	60
Figura 9 - Purificação da sMTL-13 recombinante por Ni-NTA.....	62
Figura 10 - Análise da purificação da sMTL-13 por <i>Western-blot</i>	63
Figura 11 - Produção de citocinas pró-inflamatórias por BMDCs estimuladas com sMTL-13.....	65
Figura 12 - Proliferação de células T CD4+ frente a BMDCs estimuladas com sMTL-13.....	67
Figura 13 - Produção de IFN- γ por células T CD4+ após cocultura com BMDCs.....	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Esquema básico para o tratamento da TB.....	27
Quadro 2 - Iniciadores utilizados para amplificação do gene Rv1419...	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico)
ATB - Pacientes com tuberculose ativa
APCs - Células apresentadoras de antígeno
BCG - Bacilo Camette-Guérin
BMDCs - Células dendríticas derivadas de medula óssea
BMMs - Macrófagos derivados de medula óssea
BS3 - Biossegurança 3
CFSE - Carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster
CFP - Proteínas do filtrado de cultura
CMTB - Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
CNL - Lectina *C. nebularis*
CSL - Lectina do *Cephalosporium*
DCs - Células dendríticas
D-Gal - D-Galactose
DOT - Tratamento Diretamente Observado
DFC - Doses fixas combinadas
EDTA - Ácido etilenodiamino teracético
ELISA - Ensaio imunoenzimático
ESAT-6 - Antígeno secretado precocemente de 6kDa
FBS - Soro bovino fetal
HBHA - Adesina hemaglutinina ligante de heparina
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
HRP - *Horseradish peroxidase*
IFA - Adjuvante incompleto de Freund
IFN- γ - Interferon- γ
IgG - Imunoglobulina do tipo G
IL - Interleucina
IPTG - Isopropiltiogalactosídeo
L-Gal - L-Galactose
LB - Luria-Bertani
LJ - Löwstein-Jensen
LPS - Lipopolissacarídeo
MHC - Complexo de histocompatibilidade principal
MOI - Multiplicidade de infecção
Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
PBMC - Células mononucleares de sangue periférico
PBS - Tampão fosfato
PCR - Reação em cadeia da polimerase

SDS - Dodecil sulfato de sódio

sMTL-13 - Lectina de 13 kDa secretada por *Mycobacterium tuberculosis*

TA - Temperatura ambiente

TB - Tuberculose

TB-MDR - Tuberculose resistente a múltiplas drogas

TB-XDR - Tuberculose extensivamente resistente

TCR - Receptor de célula T

Th1 - Resposta T *helper* 1

Th2 - Resposta T *helper* 2

Th17 - Resposta T *helper* 17

TNF - Fator de necrose tumoral

UFC - Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	25
1.1 Tuberculose	25
1.2 Epidemiologia da tuberculose.....	25
1.3 Resistência do bacilo aos fármacos	27
1.4 O bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
1.5 Imunopatogênese da tuberculose.....	31
1.6 Lectinas.....	35
1.7 Vacinas.....	37
2. OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo Geral	41
2.2 Objetivos específicos	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Comitê de ética para uso de animais.....	43
3.2 Local do desenvolvimento do estudo	43
3.3 Ensaio de interação da sMTL-13 da superfície de <i>Mtb</i> H37Rv com macrófagos.	43
3.4 Expressão e purificação da proteína recombinante.....	46
3.4.1 Amplificação e clonagem.....	46
3.4.2 Avaliação da transformação	47
3.4.3 Digestão dos plasmídeos	47
3.4.4 Expressão da proteína recombinante.....	48
3.4.5 Western-blot.....	49
3.4.6 Purificação da proteína recombinante	50
3.5 Ensaio de cocultura de células dendríticas com linfócitos T CD4+.....	50
3.5.1 Imunização e coleta de linfonodos	50
3.5.2 Obtenção de linfócitos a partir dos linfonodos drenantes	51
3.5.3 Separação magnética da fração CD4+.....	52
3.5.4 Marcação dos linfócitos com CFSE	52
3.5.5 Obtenção de células dendríticas derivadas de medula óssea	52
3.5.6 Cocultura e ensaio de proliferação celular	53
3.5.7 Dosagem de citocinas.....	54
3.6 Análise estatística	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Ensaio de interação da sMTL-13 da superfície de <i>Mtb</i> H37Rv com macrófagos.	57
4.2 Avaliação da capacidade da sMTL-13 gerar uma resposta imune antígeno-específica	61
5. CONCLUSÕES.....	71

1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) que, apesar de se manifestar em outros órgãos (TB extrapulmonar), afeta principalmente os pulmões (TB pulmonar), órgãos que representam não só a porta de entrada do bacilo como também o principal sítio de infecção (KAUFMANN, 2001; WHO, 2011).

A doença é disseminada pelo ar quando os indivíduos que sofrem de TB pulmonar ativa expõem gotículas contendo os bacilos, por exemplo, através da tosse. Em geral, uma pequena parcela da população, aproximadamente 5 a 10%, infectada pelo *Mtb* irá desenvolver TB; o desenvolvimento ou não da doença ativa é resultado de um balanço dinâmico entre a persistência bacteriana e a defesa do hospedeiro (KAUFMANN, 2001; COOPER, 2009; WHO, 2011). Este balanço pode ser mantido ao longo da vida, então, os indivíduos infectados não sofrerão de uma doença clínica (KAUFMANN, 2001; WHO, 2011).

O surto da doença é tardio devido ao fato do progresso da infecção ser lento. Geralmente, o *Mtb* causa uma infecção primária em crianças, já em adultos a doença é resultado de uma reativação de um foco pré-existente (RUSSELL, 2007; WHO, 2011). Essa reativação se dá normalmente quando há um imunocomprometimento do indivíduo, como infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), desnutrição, idade avançada ou estresse (RUSSELL, 2007).

Por décadas, a TB continua sendo um problema de saúde pública. Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a TB como uma emergência de saúde pública global, na época atingindo cerca de 7 a 8 milhões de pessoas por ano e causando aproximadamente 1,3 a 1,6 milhão de mortes por ano. Esses números indicam o impacto da TB na saúde pública global (WHO, 2011).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

O alto impacto da TB na saúde pública mundial está relacionado com sua incidência, prevalência e mortalidade. Em 2010, estimou-se uma incidência de 8,8 milhões de casos, sendo o continente americano responsável por 5% dos casos, enquanto o asiático somou 59% (Figura 1). Porém, a incidência de TB segue caindo lentamente desde 2006 (WHO, 2011).

Os cinco países que apresentaram maiores incidências de TB em 2010 foram Índia (2,0 a 2,5 milhões), China (0,9 a 1,2 milhão), África do Sul (0,4 a 0,59 milhão), Indonésia (0,37 a 0,48 milhão) e Paquistão (0,33 milhões a 0,48 milhão). Entretanto, o Brasil encontra-se entre os 22 países que mais possuem casos de TB, que juntos somaram 81% dos casos estimados mundialmente em 2010 (WHO, 2011).

A prevalência mundial estimada de TB em 2010 foi de 12 milhões de casos, totalizando aproximadamente 1,4 milhão de mortes, entretanto, mundialmente, a prevalência também vem caindo desde 1990, com um rápido declínio em 1997 (WHO, 2011).

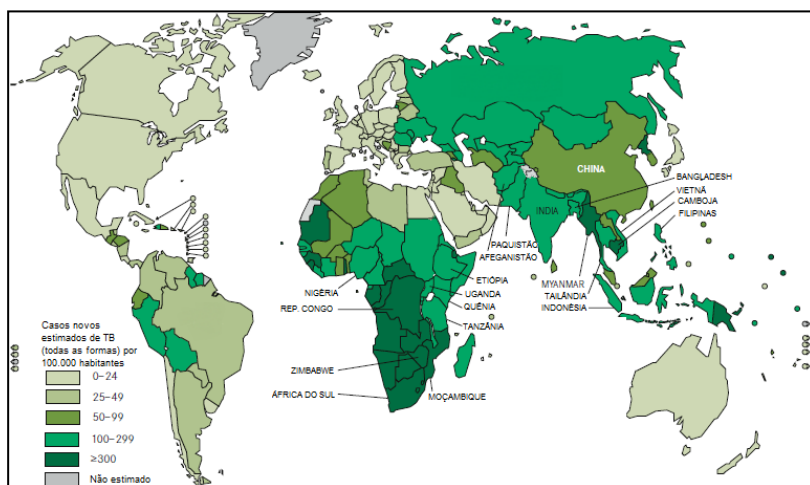


Figura 1: Números de casos incidentes em 2010 de TB no mundo por 100.000 habitantes. Adaptado de WHO, 2011.

No Brasil há uma estimativa de 85 mil casos incidentes, 92 mil casos prevalentes e 5 mil mortes anuais causadas pela TB (WHO, 2011). Em Santa Catarina houve cerca de 2.078 novos casos em 2010, sendo o estado brasileiro com proporções mais baixas de incidência em TB (27 /100.000 hab.), porém com alguns municípios apresentando proporções iguais e/ou maiores que a do Brasil e de outros países onde a situação da TB é muito grave (BRASIL, 2009; SINAN, 2011).

Um grande avanço nos cuidados e no controle da TB foi atingido com a introdução, em meados de 1990, do Tratamento Diretamente Observado (DOT) e com o lançamento da estratégia “*Stop TB*”, em 2006, pela OMS. No entanto, devido ao grande impacto na saúde pública causado pela infecção pelo *Mtb*, à ausência de uma vacina

preventiva eficaz e ao surgimento de cepas resistentes tornam-se necessárias transformações nas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento da TB.

1.3 RESISTÊNCIA DO BACILO AOS FÁRMACOS

O tratamento da TB é essencial para o controle da disseminação da doença. No entanto, é necessário que a terapia medicamentosa seja obedecida e siga os esquemas terapêuticos padronizados, sendo o DOT uma estratégia fundamental para este controle (BRASIL, 2008; 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2010; WHO, 2011). O tratamento adequado evita, assim, a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência (BRASIL, 2008; 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2010; WHO, 2011).

O Programa Nacional de Controle da Tuberculose acrescentou, em 2009, o etambutol (E) ao esquema tríptico de curta duração, que continha rifampicina (R), isoniazida (H) e pirazinamida (Z), como demonstrado no quadro 1. Os quatro fármacos estão reunidos em um único comprimido com doses fixas combinadas (DFC), o que pode melhorar a adesão ao tratamento pela simplificação do regime terapêutico (BRASIL, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2010).

Quadro 1: Esquema básico para o tratamento da TB. Adaptado de SIQUEIRA *et al.* 2010

Regime	Fármacos	Peso	Dose	Meses
2 RHZE (fase intensiva)	RHZE 150/75/400/27,5 mg - DFC	20 a 35 kg 36 a 50 kg > 50 kg	2 comp. 3 comp. 4 comp.	2
4 RH (fase de manutenção)	RH 300/200 mg (1) ou 150/100 mg (2) – comprimido ou cápsula	20 a 35 kg 36 a 50 kg > 50 kg	(1) (1)+(2) (1)+(1)	4

Fatores relacionados à biologia do *Mtb* como seu tempo prolongado para multiplicar-se, sua atividade metabólica e a sua localização intracelular são uns dos responsáveis pelo longo tratamento quimioterápico da TB.

O surgimento de cepas resistentes aos antibióticos utilizados no tratamento da TB evidencia os problemas relacionados à cura da doença

e tornou-se matéria de grande preocupação para os programas de controle da TB.

Mundialmente, estima-se 650.000 novos casos mundiais de tuberculose resistente em 2010, sendo que, neste mesmo ano, menos de 5% dos pacientes com casos novos ou previamente tratados de TB foram testados para *Mtb* resistente (WHO, 2011).

Bactérias resistentes geralmente surgem por uma seleção de cepas mutantes à quimioterapia inadequada. A resistência a pelo menos 2 dos mais importantes fármacos utilizados contra a TB, isoniazida e rifampicina, foi denominada TB resistente a múltiplas drogas (TB-MDR).

O tratamento da TB-MDR requer esquemas terapêuticos mais prolongados, que envolvem fármacos de segunda linha, de alto custo e que possuem uma toxicidade mais elevada (ZAGER e MCNERNEY, 2008).

Quando há uma resistência aos fármacos de segunda linha, a doença torna-se virtualmente não tratável, sendo denominado TB extensivamente resistente (TB-XDR). TB-XDR é definida por uma resistência pelo menos a rifampicina, isoniazida, fármaco de segunda linha injetável (capreomicina, canamicina ou amicacina) e uma fluoroquinolona (ZAGER e MCNERNEY, 2008).

A atividade antibacteriana de um antibiótico é medida em função da sua atividade inibitória, que afeta o funcionamento bacteriano, e dos mecanismos de resistência do patógeno (NGUYEN e PIETERS, 2009).

O surgimento de cepas TB-MDR e TB-XDR vem sendo associado à complexa parede celular das micobactérias, que funciona como uma barreira efetiva à passagem de antibióticos (NGUYEN e PIETERS, 2009). Estudos envolvendo a permeabilidade da parede celular das micobactérias, no entanto, sugerem que esta barreira apenas fornece uma parte do alto nível de tolerância aos antibióticos e que mecanismos sinérgicos são necessários para uma resistência frente aos antibióticos (NIKAIDO, 1994; NGUYEN e PIETERS, 2009).

Apesar da TB ser uma doença conhecida há séculos, com fármacos disponíveis para o tratamento, e ser considerada grave há muitos anos, ainda não há perspectiva de obter-se, em um futuro próximo, a eliminação da TB como problema de saúde pública.

1.4 O BACILO *Mycobacterium tuberculosis*

O *Mtb* é o principal agente causador da TB, também conhecido como bacilo de Koch, pois foi isolado e descrito em 1882 por Robert Koch. O *Mtb* pertence à classe Schizomycetes, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium* (LECHEVALIER e LECHEVALIER, 1970).

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Mycobacterium* são divididos em dois grupos, o Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e as Micobactérias Não Causadoras de Tuberculose. O *Mtb* pertence ao CMTB, composto por mais seis espécies (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* – bacilo Calmette-Guérin (BCG), *M. caprae*, *M. pinnipedii*). O “*M. canetti*”, uma variante de *Mtb* encontrada na região da Somália, ainda não foi reconhecido oficialmente como uma espécie do complexo (BRASIL, 2008).

O *Mtb* é um bacilo álcool-ácido resistente, de crescimento lento e envolvido por uma parede celular única, rica em lipídeos, longas cadeias de ácidos micólicos, arabinogalactanos, glicolipídeos, proteínas e outros componentes (KAUFMANN, 2001; COOK *et al.*, 2009).

A figura 2 ilustra a parede celular micobacteriana, composta de duas camadas, uma mais superior e outra mais inferior. Logo acima da membrana há uma camada de peptídeoglicanos ligados a arabinogalactanos que por sua vez estão ligados aos ácidos micólicos, formando o complexo micolil-arabinogalactano peptídeoglicano. A camada superior é composta de lipídeos e ácidos graxos de cadeias curtas e longas. Dispersas pela parede celular encontram-se proteínas, fosfatidilinositol, lipomanan e lipoarabinomanan, o que caracteriza a complexidade da parede celular das micobactérias (CHATTERJEE e KHOO, 1998; BRENNAN, 2003).

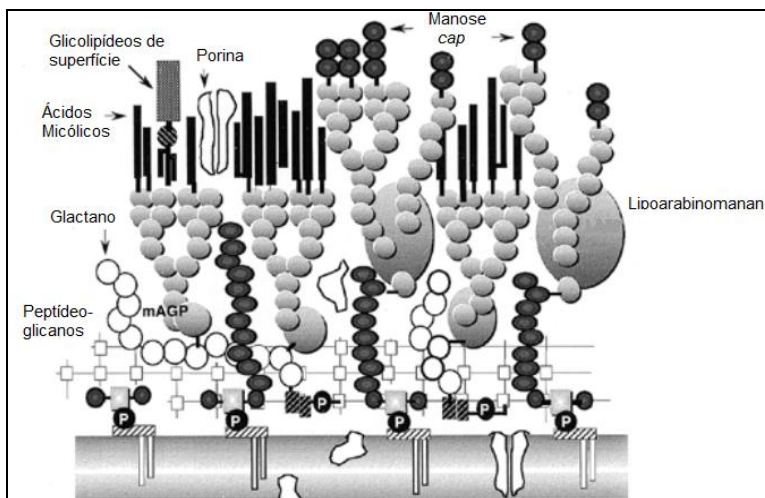


Figura 2: Esquema da parede celular micobacteriana. Adaptado de CHATTERJEE e KHOO, 1998.

Essa cobertura complexa contribui com a capacidade do bacilo em sobreviver nas células fagocitárias e fornece uma grande fonte de antígenos para uma população especializada de células T, sendo, basicamente, moléculas envolvidas na patogênese da doença (KAUFMANN, 2001; BRENNAN, 2003).

Barry e colaboradores (1998) demonstraram que quando a biossíntese de ácidos micólicos e a produção de lipídeos são afetadas, há um aumento da permeabilidade da parede celular e diminuição drástica na virulência do *Mtb*, mostrando a importância da integridade da parede celular para a sobrevivência do bacilo.

Desta forma, a complexa biologia do *Mtb* demonstrou que o mesmo possui um crescimento lento, com um tempo de replicação de aproximadamente 20 horas (COLE *et al.*, 1998; KAUFMANN, 2001; COOK *et al.*, 2009), sendo responsável pela natureza crônica da doença, complicando o diagnóstico e levando a tratamentos farmacológicos de longa duração (KAUFMANN, 2001).

Neste contexto, um grande impacto no entendimento e concepção da biologia do *Mtb*, como genoma do mesmo sendo decifrado por Cole e colaboradores (1998) juntamente a novas ferramentas de bioinformática, levou ao início de uma intensa busca por genes de interesse que possam atuar como alvos para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais, terapêuticas e diagnósticas. Porém, existe uma clara necessidade de um

melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese da TB para que essas novas estratégias sejam atingidas.

1.5 IMUNOPATOGÊNESE DA TUBERCULOSE

A imunopatogênese da TB, esquematizada na figura 3, é resultado da interação entre a virulência bacteriana e a resistência do hospedeiro, desta forma, torna-se necessária a identificação de fatores de virulência e alvos terapêuticos no micro-organismo, assim como componentes do sistema imune do hospedeiro, que poderão servir como alvos de estudo (KAUFMANN, 2001; COOPER, 2009).

As células fagocitárias desempenham um papel fundamental no reconhecimento inicial do *Mtb* bem como no direcionamento da resposta imune adaptativa das células T através da apresentação de antígenos micobacterianos, expressão de moléculas coestimulatórias e produção de citocinas (VAN CREVEL, OTTENHOFF e VAN DER MEER, 2002; TIAN *et al.*, 2005; RUSSELL, 2007).

Após a inalação do *Mtb*, os macrófagos alveolares são, provavelmente, as primeiras células envolvidas na sua fagocitose (TIAN *et al.*, 2005). Após esta fase inicial, células dendríticas (DCs) e macrófagos derivados de monócitos também participam do processo de fagocitose (HENDERSON, WATKINS e FLYNN, 1997; MOSER e MURPHY, 2000; TIAN *et al.*, 2005).

Diversos receptores de superfície influenciam a entrada do bacilo nas células fagocitárias (MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT e JANEWAY, 1997; BRIGHTBILL *et al.*, 1999; BAFICA *et al.*, 2005; ROTHFUCHS *et al.*, 2007; COURT *et al.*, 2010) e apesar do *Mtb* ter um tropismo por essas células, ele também pode interagir com outros tipos celulares, como as do epitélio alveolar. Essa ligação envolve moléculas conhecidas como adesinas, um exemplo é a adesina hemaglutinina ligante de heparina (HBHA), uma lectina presente na superfície celular do *Mtb* (MENOZZI *et al.*, 1996).

Receptores do tipo toll são mediadores conservados da resposta imune inata e são essenciais para que as células apresentadoras de antígeno (APCs) reconheçam o *Mtb*, além de poderem determinar a resistência do hospedeiro à infecção pelo bacilo (MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT e JANEWAY, 1997; BRIGHTBILL *et al.*, 1999; BAFICA *et al.*, 2005). No entanto, outros receptores como os de lectina tipo C e *scavenger* parecem promover a produção de citocinas e ativação de células T após uma interação inicial de micobactérias com as APCs, (ROTHFUCHS *et al.*, 2007; COURT *et al.*, 2010), demonstrando

a existência de diversos mecanismos e receptores de superfície pelos quais o *Mtb* é reconhecido. A maioria destas interações foi demonstrada *in vitro* e sua importância *in vivo* permanece desconhecida. Porém, se por um lado, as APCs possuem receptores de reconhecimento e ativação celular, por outro, o *Mtb* apresenta diversos produtos e mecanismos que possuem a capacidade de supressão celular e escape imunológico (VAN CREVEL, OTTENHOFF e VAN DER MEER, 2002; BAFICA *et al.*, 2005).

Após a fagocitose, o *Mtb* é capaz de inibir a maturação do fagossoma, mantendo-o em seu estágio inicial e restringindo a acidificação do mesmo, o que previne sua fusão com o lisossoma e dessa forma o bacilo torna-se capaz de sobreviver dentro da célula (RUSSELL, DANT e STURGILL-KOSZYCKI, 1996; VERGNE *et al.*, 2005).

A maturação do fagossoma é induzida por interferon- γ (IFN- γ), importante citocina produzida principalmente por linfócitos T CD4+, capaz de estimular mecanismos anti-micobacterianos nos macrófagos, como a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e também apoptose, onde o fator de necrose tumoral (TNF) possui uma atividade importante (KEANE *et al.*, 1997; HERBST, SCHAIBLE e SCHNEIDER, 2011).

Logo, o reconhecimento do *Mtb* por APCs leva a uma ativação celular que por si só irá levar à ativação de outras células e produção de citocinas em um complexo processo regulatório que é fundamental na resposta inflamatória contra o *Mtb* (VAN CREVEL, OTTENHOFF e VAN DER MEER, 2002).

A resposta imune mediada por células, ou resposta T *helper* 1 (Th1), especificamente de células T CD4+ e potencialmente de células T CD8+, possui um papel mais significativo na proteção contra a TB que a resposta humoral, ou resposta T *helper* 2 (Th2) (ORME *et al.*, 1993; SCANGA *et al.*, 2000; BARKER *et al.*, 2009). Além disso, as células da resposta T *helper* 17 (Th17) parecem ser importantes para a atração de monócitos para o sítio de infecção (PARIDA e KAUFMANN, 2010).

As células da resposta Th1 produzem diversas citocinas, como interleucinas (IL), principalmente a IL-2, IFN- γ e TNF que são críticas para a resposta protetora contra a TB (ORME *et al.*, 1993; SCANGA *et al.*, 2000; COOPER, 2009; KAUFMANN, 2010; PARIDA e KAUFMANN, 2010).

As células T CD4+ são as principais células envolvidas nessa produção de citocinas, além disso, a resposta de células T CD8+ contribui para essa proteção por secretar citocinas similares àsquelas produzidas pelas células T CD4+ e também por produzir perforinas e granzulinas, que não só levam a morte celular do macrófago que

contém o *Mtb* residente, como também atingem diretamente o patógeno (FENG *et al.*, 1999; WOODWORTH, WU e BEHAR, 2008).

A ativação dos linfócitos T depende da interação com as APCs ativadas e ocorre nos linfonodos drenantes (KAUFMANN, 2001; MCKEE *et al.*, 2010). As DCs, tipo celular chave na geração de uma resposta imune contra o bacilo, após o reconhecimento primário, fagocitam os antígenos no tecido pulmonar, amadurecem, migram para os linfonodos drenantes e induzem a ativação de linfócitos T antígeno-específicos (HENDERSON, WATKINS e FLYNN, 1997; TIAN *et al.*, 2005). Por sua vez, essas células T antígeno-específicas induzirão a contenção das bactérias em pequenas lesões granulomatosas nos pulmões, nos estágios iniciais da patogênese da TB (KAUFMANN, 2010; PARIDA e KAUFMANN, 2010). Dados sugerem que uma resposta T CD4+ é necessária para a prevenção da TB, tendo um papel importante na produção de IFN- γ e na ativação de macrófagos para o controle da persistência do bacilo durante a infecção (FENG *et al.*, 1999; SCANGA *et al.*, 2000).

Os granulomas são lesões histopatológicas características durante a infecção pelo *Mtb* e podem se formar em qualquer tecido infectado com o bacilo (PIETERS, 2008). Eles apresentam uma mistura característica de macrófagos e linfócitos e representam a resposta imune à infecção local, sendo essenciais para limitar o crescimento do *Mtb* (PETERS e ERNST, 2003). Assim, a estrutura do granuloma provavelmente representa um equilíbrio entre um agente patogênico e potencialmente perigoso e o sistema imune do hospedeiro (PIETERS, 2008).

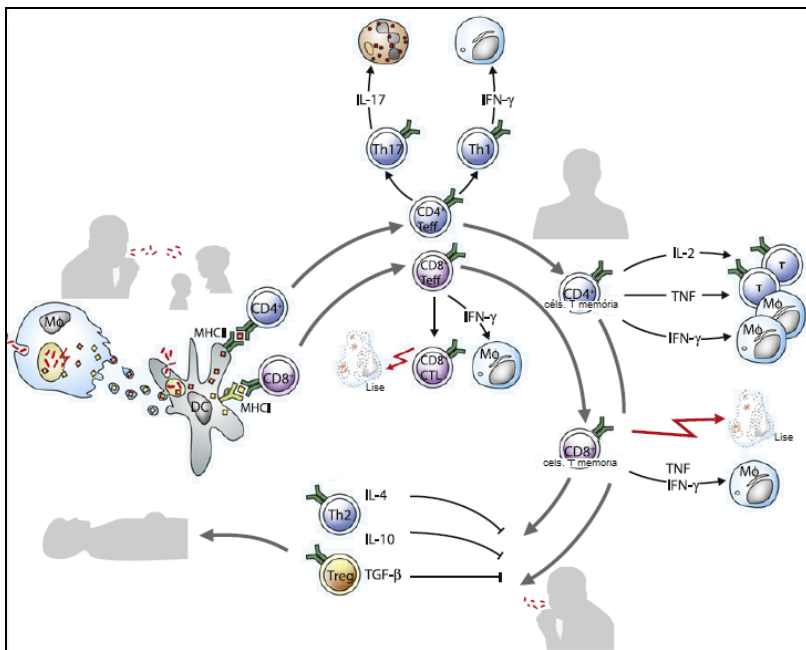


Figura 3: Base celular da resposta do hospedeiro à TB. Após a infecção do hospedeiro, macrófagos e DCs são capazes de estimular células T CD4+ e T CD8+ específicas. As células T CD4+ irão gerar uma resposta efetora do tipo Th1 e Th17, enquanto as T CD8+ irão gerar uma resposta citotóxica, além de induzirem a produção de IFN- γ . O próximo passo é o desenvolvimento de uma resposta através de células T de memória. A resposta protetora por células T CD4+ de memória se dá através da produção de diversas citocinas, como IL-2, TNF e IFN- γ , enquanto a resposta protetora por células T CD8+ de memória é devido à produção de moléculas citotóxicas, IFN- γ e TNF. Agentes “confundidores”, como IL-4, IL-10 e TGF- β , possuem a habilidade de perturbar a resposta imune contra a TB. Adaptado de KAUFMANN, 2010.

Durante a resposta Th1 contra o *Mtb*, a proporção de células T CD4+ e T CD8+ que produzem IFN- γ e a quantidade produzida dessa citocina é similar entre os dois subtipos celulares, sugerindo que ambas contribuem significativamente para a resposta imune contra a TB (FENG *et al.*, 1999; SHAMS *et al.*, 2001). No entanto, a depleção ou supressão de células T CD4+ parece ter um efeito deletério mais importante durante a resposta contra a TB que a eliminação de células T CD8+ (CARUSO *et al.*, 1999; SCANGA *et al.*, 2000).

Porém, a maioria dos estudos focam na produção de IFN- γ pelas células T CD4+ em resposta aos antígenos micobacterianos, mas outras

funções dessas células tendem a ser importantes na resposta protetora contra a TB e precisam ser mais bem estudadas para que se possam desenvolver novas estratégias de prevenção e tratamento contra a TB.

As imunidades inata e adaptativa estão intimamente ligadas, tendo as APCs um papel fundamental para o início da resposta. Deste modo, o reconhecimento de fatores micobacterianos pelo sistema imune é de importância relevante para a geração de uma resposta adaptativa contra o patógeno.

Assim, apesar do progresso no entendimento acerca da imunidade protetora contra a TB, torna-se necessária a identificação de novas moléculas proteicas expressas em *Mtb* e sua caracterização imunológica para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento da TB.

1.6 LECTINAS

Proteínas de superfície e secretadas apresentam um papel importante na manutenção e sobrevivência das bactérias e sua contribuição na imunopatogênese das doenças faz destas proteínas alvos de estudo (DE SOUZA *et al.*, 2011).

O processamento e endereçamento correto de polipeptídeos são essenciais para a sobrevivência e crescimento bacteriano. As bactérias Gram-negativas necessitam de um sistema Sec de secreção proteica para o transporte de proteínas através de sua membrana, já o *Mtb* possui sistemas de secreção especializados (LEE e SCHNEEWIND, 2001; ABDALLAH *et al.*, 2007; DE SOUZA *et al.*, 2011). O sistema Sec do *Mtb* é dependente do reconhecimento de um peptídeo sinal, geralmente localizado na porção N-terminal da proteína, que após a translocação proteica é clivado por peptidases. Porém, alguns polipeptídios ficam inseridos na membrana celular, utilizando o peptídeo sinal como âncora (LEE e SCHNEEWIND, 2001).

As proteínas secretadas pelo *Mtb* compõe a fração conhecida como proteínas do filtrado de cultura (CFP), que possui aproximadamente 257 proteínas (MALEN *et al.*, 2007). Estudos envolvendo essas proteínas e também àquelas associadas à superfície do *Mtb*, indicam que elas podem modular os processos inflamatórios e servir como alvos para a proteção imunológica. Como exemplo tem-se a lipoproteína de 19 kDa, predominantemente associada à membrana ou parede celular, que mostrou induzir uma resposta pró-inflamatória por APCs através da produção de IL12/23p40 (BRIGHTBILL *et al.*, 1999), o Antígeno secretado precocemente de 6kDa (ESAT-6), antígeno

imunodominante do CFP, que é capaz de induzir a produção de IFN- γ por células T de memória (SORENSEN *et al.*, 1995), o antígeno CFP-10, que mostrou induzir a produção de altos níveis de IFN- γ por células T e B (SKJOT *et al.*, 2000) e o complexo Ag85, que é capaz de induzir proliferação de células T e produção de IFN- γ (LAUNOIS *et al.*, 1994; LAUNOIS *et al.*, 2011).

As lectinas, uma classe de proteínas também presente no *Mtb*, são capazes de se ligar a carboidratos e através dessa ligação adquirem habilidade de mediar diversos processos biológicos. O estudo das lectinas teve início em 1888, por Stillmark, que foi o primeiro a descrever o fenômeno de hemaglutinação por extratos de plantas. Stillmark estudou a toxicidade da mamona (*Ricinus communis*) e descobriu que esta planta continha uma proteína altamente tóxica, denominando-a ricina (SHARON e LIS, 2004).

A natureza ubíqua dessas proteínas reflete o seu envolvimento em diversos mecanismos celulares - como adesão, apoptose e agregação - tornando significativo o estudo das interações entre proteínas e carboidratos e processos de reconhecimento de açúcar. (GOSWAMI *et al.*, 1994; MENOZZI *et al.*, 1996)

Até o presente momento, a HBHA é a lectina de *Mtb* mais estudada. Essa lectina liga-se a carboidratos sulfonados, como o sulfato de dextrana, e parece ser capaz de induzir interação entre micobactérias além de ser importante na adesão do *Mtb* em células epiteliais (MENOZZI *et al.*, 1996). Essa adesão em células não fagocitárias é necessária para a disseminação extrapulmonar do *Mtb*, sendo importante para a imunopatogênese da doença (PETHE *et al.*, 2001). Além disso, dados sugerem que a resposta de anticorpos à HBHA pode levar a uma imunidade protetora contra a TB e que a proteína recombinante, utilizada como reforço vacinal a BCG, foi capaz de reduzir a incidência de tuberculose disseminada (PETHE *et al.*, 2001; GUERRERO e LOCHT, 2011).

Devido à diversidade de carboidratos e suas interações com os processos celulares, é possível que uma variedade de lectinas esteja envolvida na interação inicial entre micobactérias e células hospedeiras, assim como na imunopatogênese da TB.

Neste contexto, nosso grupo descreveu, de forma pioneira, uma nova lectina de 13 kDa secretada pelo *Mtb* (sMTL-13), codificada pelo gene Rv1419, que, através de análise de bioinformática, revelou-se pertencente à família das lectinas homólogas à cadeia B da ricina (NOGUEIRA *et al.*, 2010) o que mais tarde foi confirmado por resultados preliminares de cristalografia (PATRA *et al.*, 2010).

A cadeia B da ricina está envolvida no mecanismo de interação molecular entre a ricina e a superfície das células, sendo o primeiro passo para uma intoxicação celular. A ricina possui duas subunidades, a menor delas é a cadeia A, que é capaz de inibir a síntese proteica em células de mamíferos, e a outra subunidade é a cadeia B, capaz de se ligar à membrana celular de células de mamíferos através de interação com carboidratos (OLSNES e PIHL, 1973).

A sMTL-13 compõe as proteínas do sobrenadante de cultura de *Mtb* H37Rv (cepa virulenta de laboratório) (MALEN *et al.*, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2010) e é capaz de induzir um aumento na produção de IFN- γ em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com tuberculose ativa (ATB). Por conseguinte, soros de pacientes com ATB apresentam altos títulos de imunoglobulina do tipo G (IgG) contra a sMTL-13, resposta esta diminuída após tratamento com antibióticos (NOGUEIRA *et al.*, 2010). Entretanto, não há informação a respeito da imunogenicidade desta molécula, postulada ser um alvo vacinal no controle da TB.

1.7 VACINAS

Apesar dos avanços tecnológicos e da consequente inovação que conduzem a melhoria na prevenção, diagnóstico e na terapêutica de diversas patologias, as doenças infecciosas continuam representando um grande desafio.

As vacinas podem ser constituídas por: patógenos vivos atenuados, como vírus ou bactérias menos virulentas que o patógeno real; patógenos inativados, que são previamente inativados quimicamente, por calor ou radiação; subunidades, que consistem em componentes dos patógenos, como proteínas e açúcares; DNA, basicamente composta por genes que codificam para antígenos de interesse; toxóides, que são toxinas inativadas de patógeno; e vetores recombinantes, semelhante à vacina de DNA, porém as bactérias ou vírus são utilizados como carreadores (O'HAGAN, MACKICHAN e SINGH, 2001; MCKEE *et al.*, 2010).

Para o desenvolvimento de vacinas é necessária a indução de imunidade mediada por células (O'HAGAN, MACKICHAN e SINGH, 2001), especificamente células T CD4+ e células T CD8+, que possuem um papel importante na proteção contra a TB (BARKER *et al.*, 2009). Para que possamos fazer avanços significativos no desenvolvimento de vacinas, torna-se importante o entendimento da interação entre a resposta imune celular adquirida e o patógeno, desde o início da

infecção, passando pelo progresso da doença até o seu controle (COOPER, 2009).

Embora tenhamos feito um progresso significativo, no que diz respeito à compreensão da função dos linfócitos, tanto na resposta primária como secundária contra a infecção por *Mtb*, a atual vacina em uso contra a TB, derivada de *M. bovis* e chamada de BCG, teve seu primeiro teste em seres humanos em 1921, quando não se tinha conhecimentos da função dos linfócitos durante a TB (COOPER, 2009; LIU, 2009).

Mais de 3 bilhões de indivíduos foram vacinados com a BCG, apresentando mais de 80% de eficácia contra formas severas da doença, incluindo meningite e TB miliar, porém, apesar de sua ampla utilização em crianças, sua eficácia contra a TB pulmonar não é comprovada, sendo incapaz de reduzir a carga global da TB (COOPER, 2009; LIU, 2009; KAUFMANN, HUSSEY e LAMBERT, 2010).

Para reduzir o impacto da doença, novas estratégias de vacinação contra a TB visam aumentar o período de imunidade protetora ou melhorar a vacinação com a BCG, não só em crianças, mas também em adolescentes e adultos (LIU, 2009; KAUFMANN, HUSSEY e LAMBERT, 2010).

Uma série de novas abordagens para o desenvolvimento de vacinas contra a TB vem sendo estudadas, tais como vacinas de DNA, cepas atenuadas de *Mtb* e a utilização de proteínas secretadas a partir de filtrado de cultura do bacilo (CARPENTER, WILLIAMSON e EYLES, 2005; LIU, 2009). No caso de vacinas de subunidade, como misturas de proteínas de filtrado de cultura de *Mtb*, procura-se identificar antígenos que induzem fortemente a produção de IFN- γ (LIU, 2009).

Os componentes do CFP de *Mtb*, como o complexo Ag85, são bastante imunogênicos. Esquemas de vacinação com membros do complexo Ag85 mostraram que o mesmo é capaz de induzir fortemente uma resposta Th1 e Th2 em camundongos, cobaias e primatas não humanos, sendo um potencial antígeno protetor contra desafio com a cepa H37Rv in vivo (BALDWIN *et al.*, 1999; LANGERMANS *et al.*, 2005).

Estes antígenos estão em testes clínicos de fase I e II como vetores recombinantes, onde o vírus vaccínia modificado expressa o Ag85, como protocolos de reforço da BCG ou como vacinas de subunidade de proteínas fusionadas com ESAT-6 (WHO, 2011).

Uma nova geração de vacinas contra a TB, em um futuro próximo, deve oferecer uma proteção maior que a BCG, além de ser segura o suficiente para ser usada em áreas endêmicas para o HIV. No entanto, atualmente, nenhuma vacina que esteja em ensaios clínicos em

seres humanos mostrou-se mais eficiente que a BCG em estudos envolvendo modelo animal (LIU, 2009; KAUFMANN, HUSSEY e LAMBERT, 2010).

Desta forma, estudos envolvendo o reconhecimento de novos antígenos relacionados à fase ativa ou latente da doença, bem como novas estratégias de construção e administração de vacinas são importantes para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção.

A **hipótese** deste estudo é a de que a **sMTL-13 de *Mtb*, imunologicamente reconhecida durante ATB, é imunogênica** e assim pode servir como um antígeno candidato à construção de uma vacina.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a imunogenicidade da sMTL-13 em modelo murino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Confirmação da presença da sMTL-13 na superfície celular do *Mtb*;
- 2) Avaliação da importância da sMTL-13 na interação inicial entre o *Mtb* e macrófagos;
- 3) Avaliar a capacidade da sMTL-13 em gerar uma resposta imune antígeno-específica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

Camundongos fêmeas, da linhagem C57BL/6, com idade entre 6 e 8 semanas, foram utilizados para os experimentos. Os animais foram alimentados em regime *ad libitum* e mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h a temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 2$. Todos os experimentos que utilizaram animais neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFSC (CEUA – UFSC), sob protocolo PP 00517.

3.2 LOCAL DO DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

O trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia – LIDI – do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – MIP – do Centro de Ciências Biológicas – CCB – da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

3.3 ENSAIO DE INTERAÇÃO DA SMTL-13 DA SUPERFÍCIE DE *MTB* H37RV COM MACRÓFAGOS

3.3.1 CULTIVO E PREPARO DO *MTB* H37RV

Toda a metodologia envolvendo *Mtb* foi realizada em fluxo laminar com nível de biossegurança 3 (BS3), utilizando equipamento de proteção individual adequado (máscaras N-95 3M, luvas, tocas, propés e jalecos descartáveis).

A cultura da cepa de referência virulenta de laboratório de *Mtb* H37Rv foi realizada a partir de amostras congeladas que foram semeadas em meio sólido Löwestein-Jensen (LJ - Laborclin) e cultivadas a 37°C por 4 a 6 semanas.

Após o crescimento bacteriano, as colônias foram removidas do meio LJ, transferidas para tubos contendo pérolas de vidro e meio líquido Middlebrook 7H9 (BD Biosciences) para agitação em vórtex e consequente repouso. A concentração de bactérias foi ajustada através da comparação da turbidez da suspensão bacteriana à turbidez do tubo nº1 da escala McFarland (3×10^8 bactérias/ml).

3.3.2 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DA SMTL-13 NA SUPERFÍCIE CELULAR DO MTB H37RV

As bactérias foram preparadas conforme descrito no item anterior e 3×10^7 bactérias foram adicionadas em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços com fundo em “U”, em um volume final de 100 μ l. As bactérias foram lavadas com 200 μ l de tampão fosfato (PBS), que consiste em NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KCl 2.7 mM em pH de 7.4, e centrifugadas a $3.000 \times g$ por 10 min a 20 °C.

Após a centrifugação, realizou-se a incubação com os anticorpos primários, na concentração de 10 μ g/ml de controle de isotipo IgG e de monoclonal anti-sMTL-13, obtido em colaboração com ICC/Fiocruz Paraná. Como controle adicional, realizou-se uma incubação prévia do monoclonal anti-sMTL-13 com 10 μ g/ml de CFP *Mtb* H37Rv.

A placa foi incubada a temperatura ambiente (TA) por 1 h, lavada como anteriormente e então 2 μ g/ml de anticorpo secundário, IgG *anti-mouse* Alexa 488 (Invitrogen), foram adicionados em um volume final de 200 μ l.

Após 1 h de incubação a TA, as bactérias foram novamente lavadas, suspensas em paraformaldeído a 4% e incubadas por 16-18h a 4 °C.

As células foram avaliadas por citometria de fluxo, FACSCanto II (BD Bioscience) e analisadas no software FlowJo 7.2.2.

3.3.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

Para a obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMMs), camundongos fêmeas, pesando entre 25-35g, da linhagem C57BL/6 proveniente do Biotério da UFSC, foram sacrificados e tiveram suas patas traseiras dissecadas e os ossos, fêmur e tíbia, removidos e mantidos em meio DMEM (Gibco) contendo 10 U/ml e 10 μ g/ml de penicilina e estreptomicina (Gibco), respectivamente. Em fluxo laminar, as extremidades destes ossos foram cortadas com o auxílio de lâmina de bisturi. Em seguida, utilizando-se uma seringa de 3 a 5 ml, lavou-se o interior dos ossos com DMEM para a remoção de toda a medula óssea.

A suspensão de células obtida foi centrifugada a $1.200 \times g$ em tubo cônico de centrifuga de 50 ml, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 36 ml de meio DMEM completo, que

contém 10 U/ml e 10 µg/ml de penicilina e estreptomicina (Gibco), respectivamente, 2 mM de L-glutamina (Gibco); 1 mM de piruvato de sódio (Sigma), 25 µM de HEPES (Cellgro), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, Hyclone) e 20% de sobrenadante de L929. Foram distribuídos 3 ml de suspensão celular por poço de cada uma das placas de cultura celular de 6 poços e as mesmas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Ao quinto dia de cultivo, foram adicionados 2 ml de DMEM completo contendo 10% de FBS e 20% de sobrenadante de L929, em cada poço, para diferenciação dos macrófagos. As placas voltaram a ser incubadas nas mesmas condições.

Ao sétimo dia de cultivo, as culturas foram lavadas uma vez com PBS e as células aderentes removidas através da adição de Tripsina/ácido etilenodiamino teracético (EDTA) 0,05% (Gibco) e jateamento vigoroso da monocamada com micropipeta de 1 ml. Após a tripsinização, as células foram transferidas para um tubo cônico de centrífuga de 50 ml e o volume foi completado com DMEM contendo 10% de FBS, a fim de inativar a ação da tripsina. A suspensão de células obtida foi centrifugada a 1.200 x g, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspendidas em 5 ml de meio DMEM e contadas em Câmara de Neubauer, após diluição de 20 vezes em reagente azul de tripan (Gibco), para avaliação da viabilidade celular.

Após a contagem das células, as mesmas foram suspendidas em volume necessário de DMEM completo contendo 10% de FBS para a concentração de 2×10^6 células/ml e 100 µl de suspensão celular foram adicionados em cada poço de uma placa de cultura celular de 96 poços com fundo chato.

3.3.4 ENSAIO DE INTERAÇÃO DO MTB COM MACRÓFAGOS

Primeiramente, para o preparo dos carboidratos, pesou-se a D-Galactose (D-Gal, Sigma) e L-galactose (L-Gal, Sigma) para obtenção da solução mãe na concentração de 2 M, em PBS. Esta solução mãe foi filtrada em filtro para seringa de porosidade 0,22 µm (TPP) para esterilização da solução.

Em uma placa de cultura de 96 poços de fundo em “U”, adicionou-se 100 µl da suspensão de *Mtb*, obtida como descrito anteriormente, e as bactérias foram então incubadas com diferentes concentrações de carboidratos (0,05, 0,1 e 0,2 M), por 30 min., em banho de gelo. Após o período de incubação, a placa foi lavada 2 vezes

com 200 µl de PBS, através de centrifugação a 3.000 \times g por 10 min. Após a lavagem, as bactérias foram suspensas em 100 µl de meio DMEM completo, contendo 10% de FBS, e adicionadas aos macrófagos (2×10^5 /poço), obtidos conforme descrito anteriormente, em uma multiplicidade de infecção (MOI) igual a 1.

Os macrófagos infectados ou não foram incubados a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 18h. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 3.000 \times g por 10 min, o sobrenadante foi coletado para dosagem de TNF por ensaio imunoenzimático (ELISA) e as células foram lisadas através da adição de 200 µl de saponina (Vetec) a 1% em PBS, para posterior semeadura em ágar 7H10 e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

3.3.5 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

Foram preparadas placas de Petri contendo meio ágar Middlebrook 7H10 (BD Biosciences) enriquecido com 10% de OADC, que consiste em ácido oleico, albumina bovina (fração V), dextrose e catalase. As células lisadas com saponina 1% foram suspensas vigorosamente, com auxílio de uma pipeta, e, em seguida, foram semeados 50 µl de cada poço, com auxílio de um *swab*, nas placas de Petri, em duplicata. Estas placas foram vedadas com parafilme e incubadas a 37 °C. Ao final de 28 dias, realizou-se a contagem UFC nas placas de Petri.

3.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para a obtenção da sMTL-13 utilizou-se a técnica de DNA recombinante, utilizando a bactéria *Escherichia coli* como hospedeira.

3.4.1 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM

A sequência nucleotídica do gene Rv1419, que codifica a proteína sMTL-13, foi amplificada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, demonstrados no quadro 2, que introduziram sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *XhoI* no produto da PCR, sem a presença do códon de parada, utilizando o DNA da cepa de *Mtb* H37Rv como molde. As

condições de amplificação foram baseadas na desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 36 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 min, hibridização a 56 °C por 1 min e extensão dos iniciadores a 72 °C por 1 min e foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient).

Quadro 2: Iniciadores utilizados para amplificação do gene Rv1419.

Iniciadores	Sequência
Iniciador <i>forward</i>	5' GGAATTCCATATGGGTGAATTACGGTTG 3'
Iniciador <i>reverse</i>	5' CCGCTCGAGCGGCACGCTATCCCA 3'

O produto da PCR, de 500 pares de base, foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega). Esse vetor é linearizado e contém timidinas na região 3'-terminal, o que favorece a inserção de produtos de PCR por prevenir a recircularização do vetor além de possuir genes de resistência à ampicilina.

Após a clonagem, 1 µl do plasmídeo foi inserido em *E.coli* DH5a eletrocompetente por eletroporação e as mesmas foram semeadas em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) ágar, que consiste em 1% de tripton, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, 0,8% de ágar em pH 7,5, acrescido de 100 µg/ml de ampicilina. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h.

3.4.2 AVALIAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO

Apenas as colônias que cresceram em meio LB contendo ampicilina possuíam o plasmídeo, entretanto, para confirmar se o plasmídeo inserido possuía o inserto (gene Rv1419), foi realizado um PCR conforme condições previamente descritas.

Após a seleção dos clones positivos, foi realizada uma purificação plasmidial através do kit *Ilustra Plasmid Prep Mini Spin kit* (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante, e o produto da purificação foi analisado em gel de agarose 1,5%.

3.4.3 DIGESTÃO DOS PLASMÍDEOS

O plasmídeo purificado e o vetor de expressão pET21a (Novagen, USA), que precisa ser linearizado, foram digeridos com 5U de enzimas

(*NdeI* e *XhoI*) em um volume final de 20 μ l em tampão adequado para cada enzima. As amostras foram incubadas a 37 $^{\circ}$ C, em banho seco e após a digestão correu-se um gel de agarose 1,5% para observação das bandas e posterior purificação das bandas de interesse através do kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare), conforme protocolo do fabricante.

3.4.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Após a purificação do DNA, o gene *Rv1419* foi subclonado no vetor de expressão pET21a (figura 4) para a expressão da proteína sMTL-13. Este plasmídeo insere 6 resíduos de histidina na porção C-terminal da proteína e possui genes de resistência à ampicilina.

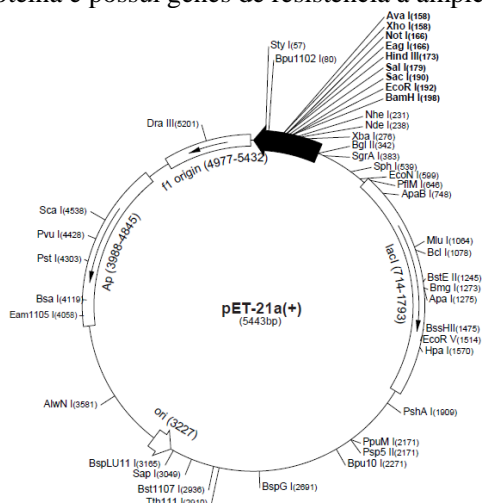


Figura 4: Representação esquemática do vetor de expressão pET21a (Novagen, USA).

Bactérias *E. coli* DH5 α eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação com aproximadamente 20 ng de DNA e semeadas em meio LB ágar, acrescido de 100 μ g/ml de ampicilina, para a seleção de colônias positivas, como descrito anteriormente.

Após a seleção, o plasmídeo foi purificado pelo kit *Illustra Plasmid Prep Mini Spin kit* (GE Healthcare) e então bactérias *E. coli* BL21(DE3) eletrocompetentes foram transformadas com aproximadamente 20 ng de DNA. Para testar a expressão da sMTL-13 recombinante, as bactérias foram expandidas primeiramente em 50 ml

de meio LB até um valor de OD₆₀₀ entre 0,5 e 0,8 a 37 °C e a expressão foi induzida na presença de 1 mM de isopropiltiogalactosídeo (IPTG).

Após 6h de indução, as bactérias foram centrifugadas em tubo cônico de centrífuga de 50 ml a 5.000 \times g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de bactérias foi mantido em gelo. As células foram suspensas completamente adicionando 4 ml de solução de lise, que consiste em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, contendo NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, glicerol 10% e inibidor de protease (Sigma). As células foram submetidas à sonicação (6 ciclos de 30 segundo na potência 12) em banho de gelo (sonicador modelo 120 Sonic Dismembrator - Fisher Scientific). Após esta etapa, a amostra foi centrifugada a 12.000 \times g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o precipitado foi suspenso em solução de lise (em caso de expressão em corpos de inclusão).

As proteínas totais foram quantificadas pelo método de BCA (Pierce), conforme protocolo do fabricante, e a expressão foi confirmada através de *Western-blot*.

Após a expressão da sMTL-13 recombinante ser confirmada, seguiu-se o protocolo de expressão de proteína descrito por Patra e colaboradores (2011), utilizando 4 l de cultura, induzidos nas mesmas condições anteriores.

3.4.5 WESTERN-BLOT

Primeiramente, as amostras foram preparadas diluindo 10 μ g de proteínas em tampão LDS 4x (Invitrogen) e incubando a 95 °C por 5 min em banho seco para desnaturação proteica. Após o preparo das amostras, foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE aplicando 20 μ l do preparado em cada canaleta de um gel Bis-tris, 4-12%, 1,0 mm (Invitrogen), utilizando como tampão de corrida o *NuPAGE Running Buffer 20x* (Invitrogen), nas condições 200 V/125 mA. A transferência para a membrana de nitrocelulose foi realizada utilizando o módulo *XCELL II Blot Module* da Invitrogen, seguindo as especificações do fabricante.

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada em tampão de lavagem, que consiste em TBS (20 mM de Tris-base, 500 mM NaCl pH 8,0) acrescido de 0,1% de Tween-20 (Sigma), e então os sítios inespecíficos foram bloqueados com tampão de bloqueio (tampão de lavagem contendo 5% de leite em pó desnatado) por 1 h a TA, sob

agitação constante. Em seguida, a membrana foi novamente lavada, foi adicionado o anticorpo primário, monoclonal anti-sMTL-13 purificado a 2 µg/ml ou anti-HIS (Sigma) diluído 10.000 vezes em tampão de bloqueio e a membrana foi incubada por 16 a 18 h a 4°C, sob agitação. A membrana então foi lavada e incubada por 1 h, a TA e sob agitação constante, com o anticorpo secundário (*anti-mouse* IgG, HRP-linked, Cell Signaling), diluído 2.000 vezes em tampão de bloqueio. Por fim, a membrana foi lavada e revelada com o kit ECL (Pierce), que consiste em um substrato quimioluminescente para a enzima peroxidase utilizada no anticorpo secundário da reação.

3.4.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A purificação foi realizada através de cromatografia de afinidade pela histidina, utilizando a coluna de agarose Ni-NTA (QIAGEN). Resumidamente, o volume a ser utilizado da resina foi transferido para uma coluna de separação e, após equilibrar a coluna com o tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, contendo NaCl 300 mM, imidazol 15 mM, β-mercaptoetanol 10 mM e glicerol 10%), o lisado foi adicionado à resina e mantido sob agitação por 1 h a 4 °C.

Após o período de incubação, o fluxo foi coletado, a resina foi lavada três vezes com tampão de lavagem (tampão de lise contendo 15 mM de imidazol) e a proteína foi eluída 6 vezes com tampão de eluição (tampão de lise com gradiente de imidazol de 15-300 mM).

Para analisar a eficiência da purificação da proteína, foi realizado uma eletroforese SDS-PAGE em gel Bis-tris, 4-12%, 1.0 mm, como descrito anteriormente, e para confirmar a purificação da sMTL-13, realizou-se um *Western-blot*, utilizando como anticorpo primário o anticorpo monoclonal purificado contra a sMTL-13.

3.5 ENSAIO DE COCULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COM LINFÓCITOS T CD4+

3.5.1 IMUNIZAÇÃO E COLETA DE LINFONODOS

Para os estudos de imunogenicidade da proteína sMTL-13, foram utilizados camundongos fêmeas, pesando entre 25-35 g, da linhagem C57BL/6, criados e mantidos no Biotério da UFSC.

Os camundongos foram expostos, por via subcutânea, a uma dose de 10 µg de sMTL-13 solúvel, CFP ou Ag85 na presença do Adjuvante

Incompleto de Freund (IFA), em um volume final de 50 μ l. O esquema de exposição realizado foi de uma imunização seguida de um reforço com intervalo de 7 dias, utilizando a mesma concentração de proteínas e o mesmo adjuvante. No dia 9 foram coletados os linfonodos drenantes da via subcutânea (axilares, poplíteos, inguinais e ilíacos), apontados na figura 5, para obtenção dos linfócitos utilizados para avaliação da resposta proliferativa específica a sMTL-13.

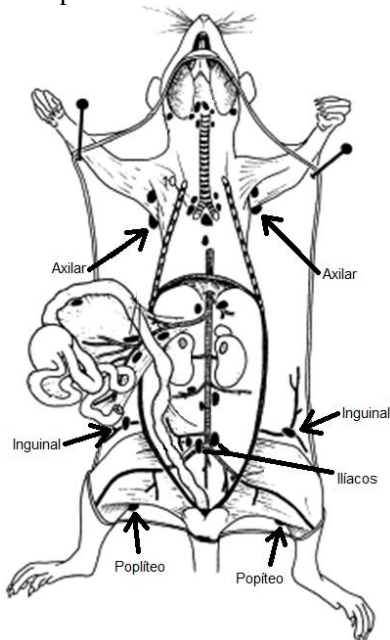


Figura 5: Esquema dos linfonodos drenantes coletados para obtenção de células CD4+. Adaptado de VAN DE BROECK; DERORE; SIMOENS, 2003.

3.5.2 OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS A PARTIR DOS LINFONODOS DRENANTES

Os linfonodos foram macerados em Cell Strainer, 70 μ m (BD Bioscience), com auxílio de um êmbolo de seringa. O macerado foi lavado com 5 ml de PBS contendo 5 mM de EDTA (MolBio) em um tubo cônico de centrifuga de 50 ml e então centrifugado a 1.500 \times g por 10 min. Os linfócitos obtidos foram contados e avaliados quanto a sua viabilidade em câmara de Neubauer, após diluição de 10 vezes em azul de tripan.

3.5.3 SEPARAÇÃO MAGNÉTICA DA FRAÇÃO CD4+

Brevemente, os linfócitos obtidos dos linfonodos drenantes foram centrifugados a $300 \times g$ por 10 min e 10^7 células foram suspensas em 90 μ l de solução de separação contendo 0,5% de albumina bovina (Inlab) em PBS. Foram adicionados 10 μ l de Microbeads CD4 (L3T4) (Macs Myltenil Biotec) à suspensão celular que foi então incubada por 15 min a 4 °C. Após o período de incubação, as células foram lavadas e suspensas em solução de separação para então as células CD4+ serem separadas através de coluna magnética, do tipo LS (Macs Separator – Myltenil Biotec), conforme protocolo do fabricante.

3.5.4 MARCAÇÃO DOS LINFÓCITOS COM CFSE

Os linfócitos CD4+ foram marcados com o kit CellTrace™ CFSE Cell Proliferation kit (Molecular Probes) com 2,5 μ M de carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) por 8 min a TA em meio RPMI 1640 (Gibco) sem FBS.

O método baseia-se na capacidade do CFSE em marcar células viáveis com uma molécula fluorescente, a carboxifluoreceína, através de ligação covalente com o DNA destas células. Após cada divisão celular, há uma redução para a metade da fluorescência para as células filhas.

Após a marcação, foi adicionada uma solução de FBS a 70%, em PBS, e então o volume foi completado para 30 ml com meio RPMI 1640 contendo mais 10% de FBS. As células foram centrifugadas a $2.000 \times g$ por 5 min e lavadas com meio RPMI 1640 contendo 10% de FBS por 3 vezes. Ao final, as células foram suspensas em meio RPMI 1640 completo, que contém 10 U/ml e 10 μ g/ml de penicilina e estreptomicina (Gibco), respectivamente, 2 mM de L-glutamina (Gibco); 1 mM de piruvato de sódio (Sigma), 25 μ M de HEPES (Cellgro), suplementado com 10% de FBS a uma concentração final de 2×10^5 em 100 μ l.

3.5.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA

Para obtenção das células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs), camundongos fêmeas pesando entre 25-35 g da linhagem C57BL/6, provenientes do Biotério da UFSC, foram sacrificados e

tiveram suas patas traseiras dissecadas e os ossos, fêmur e tíbia, removidos e mantidos em meio RPMI 1640 contendo 10 U/ml e 10 µg/ml de penicilina e estreptomicina, respectivamente. Em fluxo laminar, as extremidades destes ossos foram cortadas com o auxílio de lâmina de bisturi. Em seguida, utilizando-se uma seringa de 3 a 5 ml, lavou-se o interior dos ossos com RPMI 1640 para a remoção de toda a medula óssea.

A suspensão de células obtida foi suspensa diversas vezes com auxílio de pipeta automática de 1.000 µl e as células foram contadas em Câmara de Neubauer, após diluição de 100 vezes em reagente de Turk, que consiste em uma solução de 97% de água, 1% de solução aquosa de violeta genciana a 1% (Sigma) e 2% de ácido acético. Após a contagem das células, as mesmas foram suspensas em volume necessário de RPMI 1640 completo, contendo 10% de FBS, para a concentração de 5×10^5 células/ml.

O volume de 10 ml de células foi distribuído em placas de Petri e foi suplementado com 20 ng/ml de GM-CSF. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. No 3º dia de cultivo, o meio foi renovado e no 7º dia as células foram coletadas, transferidas para tubos cônicos de centrifuga de 50 ml e centrifugadas a 1.500 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 5 ml de meio RPMI 1640 completo para posterior contagem de células em câmara de Neubauer. Após a contagem de células, as mesmas foram suspensas em meio RPMI 1640 completo contendo 10% de FBS para uma concentração final de 1×10^5 células/ml. Adicionou-se, então 200 µl de suspensão celular por poço em uma placa de cultura de células de 96 poços de fundo em “U” e a mesma foi incubada a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂.

3.5.6 COCULTURA E ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

As BMDCs foram estimuladas ou não com 1 ou 10 µg/ml de sMTL-13, 1 ou 10 µg/ml CFP ou 50 ng/ml de lipopolissacarídeo (LPS) e então incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, baseado do protocolo de Švajger e colaboradores (2011). Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 1.200 x g por 10 min, o sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas e as células foram lavadas 1 vez com 200 µl de PBS, quando, então, 200 µl de uma

suspensão contendo 1×10^6 células/ml de linfócitos T CD4+, marcados com CFSE, foram adicionados para o ensaio de cocultura.

A cocultura dos linfócitos T CD4+ com as BMDCs foi incubada a 37 °C a 5% de CO₂ por 72 h, seguindo o protocolo descrito por Báfica e colaboradores (2005). Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a $1.200 \times g$ por 10 min, o sobrenadante foi coletado para dosagem de IFN- γ , as células foram lavadas 1 vez com 200 μ l PBS e por final suspendidas em PBS contendo 0,1% de FBS (Gibco) para aquisição dos dados em citometria de fluxo, FACSCanto II (BD Biosciences). A população de linfócitos foi analisada para a proliferação via diluição do CFSE, utilizando o software FlowJo.

3.5.7 DOSAGEM DE CITOCINAS

A concentração de TNF, IL-6, IL12/23p40 e IFN- γ nos sobrenadantes foi determinada pelo método de ELISA sanduíche, seguindo o protocolo no fabricante (eBioscience). Basicamente, placas de ELISA Nunc MaxiSorp foram sensibilizadas com 100 μ l do anticorpo de captura previamente diluído em *Coating buffer*, fornecido pelo fabricante. As placas foram incubadas por 16 a 18 h a 4° C e após o período de incubação, as mesmas foram lavadas 5 vezes com 200 μ l de tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween-20) na lavadora de ELISA (DYNEX Ultrawash Plus). As placas foram bloqueadas com 200 μ l de tampão de bloqueio (PBS contendo 0,05% de Tween-20 e 5% de leite em pó desnatado) por 1 h a TA. Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas 5 vezes, 100 μ l dos sobrenadantes a serem testados e do padrão foram adicionados e a placa foi incubada por 16 a 18 h a 4 °C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas e foram adicionados 100 μ l de anticorpo de detecção biotilado diluído em *Assay diluent*, fornecido pelo fabricante. As placas foram incubadas por 2 h a TA e então lavadas 5 vezes. Foram adicionados 100 μ l de avidina conjugada com a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) e novamente as placas foram incubadas a TA, por 30 min. Por fim, as placas foram lavadas 7 vezes e 100 μ l do substrato ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS 1-componet) (KPL) foram adicionados. Após o desenvolvimento de cor, a reação foi parada com uma solução contendo 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e a leitura foi realizada em leitora de placa de ELISA (Biotek) a 540 nm.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apresentados estão expressos como média \pm erro padrão da média. A análise estatística entre mais de 2 grupos foi realizada através do teste ANOVA de uma via seguida do teste Newman-Keuls. Para os grupos com mais de duas variáveis, foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prism 5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIO DE INTERAÇÃO DA SMTL-13 DA SUPERFÍCIE DE *MTB* H37RV COM MACRÓFAGOS

Através de uma análise por *Western-blot* nosso grupo demonstrou a presença da sMTL-13 no CFP de *Mtb* e também na fração da parede celular do bacilo, porém em menor quantidade (NOGUEIRA et al., 2011). A presença da lectina da parede celular do *Mtb* foi confirmada através de citometria de fluxo, incubando o monoclonal anti-sMTL-13 com a cepa *Mtb* H37Rv (Figura 6).

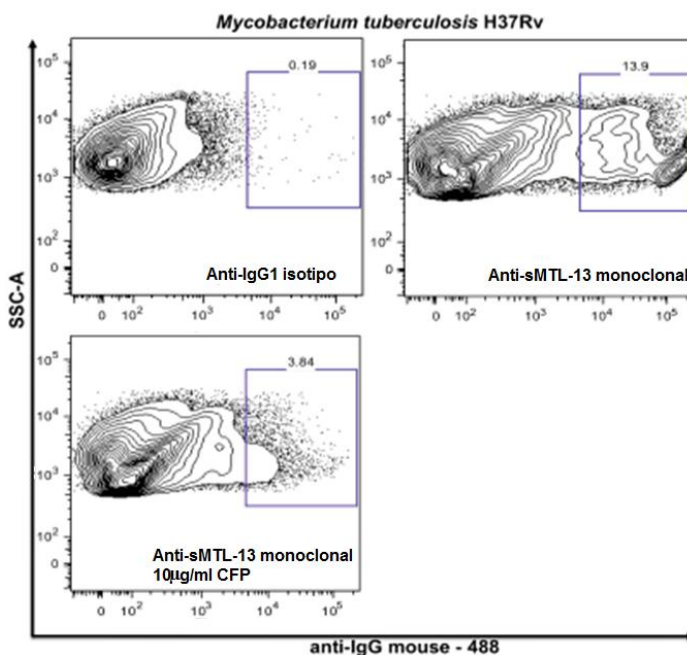


Figura 6: sMTL-13 está presente na superfície celular de *Mtb*. A cepa H37Rv foi incubada por 1h a TA com 10 µg/ml de controle isotipo, monoclonal anti-sMTL-13 ou monoclonal anti-sMTL-13, previamente incubado com 10 µg/ml CFP. Após a incubação utilizou-se anti-IgG Alexa 488 para visualização da marcação da parede celular por citometria. Os resultados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

Esses dados sugerem que a sMTL-13 pode ser exportada e ficar ancorada na parede celular, através do seu peptídeo sinal, antes de ser secretada.

A complexa estrutura da parede celular micobacteriana contribui, claramente, para interação do bacilo com células do hospedeiro, sendo as proteínas desta fração celular, muitas vezes, importantes antígenos (BARRY, 2001; SINHA *et al.*, 2005).

Sabe-se que as lectinas foram previamente descritas como adesinas, sendo responsáveis pela interação inicial do patógeno com células do hospedeiro. Diversos micro-organismos, como o *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* e *Streptococcus pneumoniae*, utilizam estruturas lectínicas para ancorar na superfície celular (JACOBSON e DOYLE, 1996). Como exemplo na TB, temos a HBHA de *Mtb*, que se liga a células epiteliais levando à disseminação extrapulmonar do bacilo (PETHE *et al.*, 2001).

Sabendo que os componentes da parede celular são moléculas envolvidas na patogênese de doenças e dada a grande variedade de carboidratos presentes nessa fração celular, que por sua vez possuem interação com diversos processos biológicos, nosso grupo investigou a influência da incubação do *Mtb* H37Rv com a D-Gal, carboidrato que possui afinidade pela sMTL-13, durante a infecção de macrófagos de cultura.

Dados não publicados (NOGUEIRA *et al.*) já demonstraram que a sMTL-13 solúvel é capaz de induzir a produção de TNF em macrófagos de linhagem J774. Os macrófagos são células fagocitárias importantes para o controle da TB por induzir uma intensa resposta pró-inflamatória através de produção de citocinas, principalmente TNF, e quimiocinas, que irão levar a um intenso recrutamento de células T CD4+, CD8+ e *natural killers*, que por sua vez irão induzir outras citocinas e quimiocinas que amplificarão a resposta inflamatória e a contenção da infecção (RUSSELL, 2007).

Para essa análise, BMMs foram infectados com *Mtb* previamente incubado com D-Gal e L-Gal, conforme descrito nos *Materiais e Métodos*. Após 18 h de infecção, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de TNF e as células foram lisadas com saponina 1% para contagem de UFC.

Os resultados demonstram uma diminuição de cerca de metade do número de UFC intracelulares na presença de 0,2 M de D-Gal (Figura 7A). Em contraste, não houve diminuição do número de UFC quando as bactérias foram incubadas com L-Gal. De maneira similar, a

produção de TNF pelos BMMs (Figura 7B) seguiu a mesma tendência das UFC.

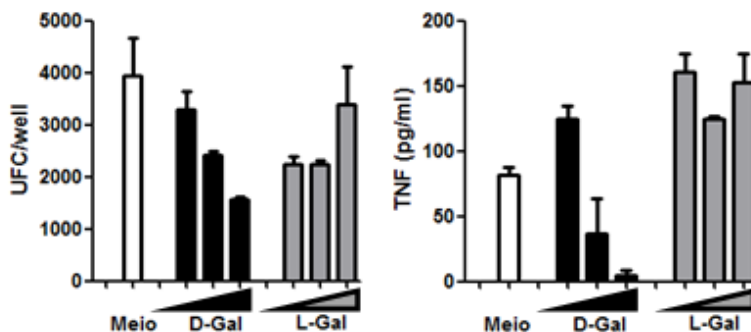


Figura 7: Avaliação da interação da D-Gal com a superfície do *Mtb*. BMMs (2×10^5) foram infectados com *Mtb* (MOI = 1) tratados com D-Gal e L-Gal, em diferentes concentrações (0,05, 0,1 e 0,2 M). Após 18 h de infecção, o sobrenadante foi coletado para dosagem de TNF (B) e as células foram lisadas para contagem de UFC intracelular. Os dados apresentados estão expressos como média \pm erro padrão da média de triplicatas; * diferença estatística significativa ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni) medida entre as concentrações de cada carboidrato e o meio.

A figura 8A demonstra, por microscopia óptica, que os BMMs não tiveram sua aparência alterada após infecção com as bactérias tratadas com D-Gal, sendo utilizadas como controles células infectadas com *Mtb* não tratado. A figura 8B mostra um painel das placas de 7H10 onde foram semeados os extratos de BMMs infectados, após lise com saponina 1%, mostrando uma variação visível do número de UFC, porém sem alteração nas características físicas das colônias de *Mtb*.

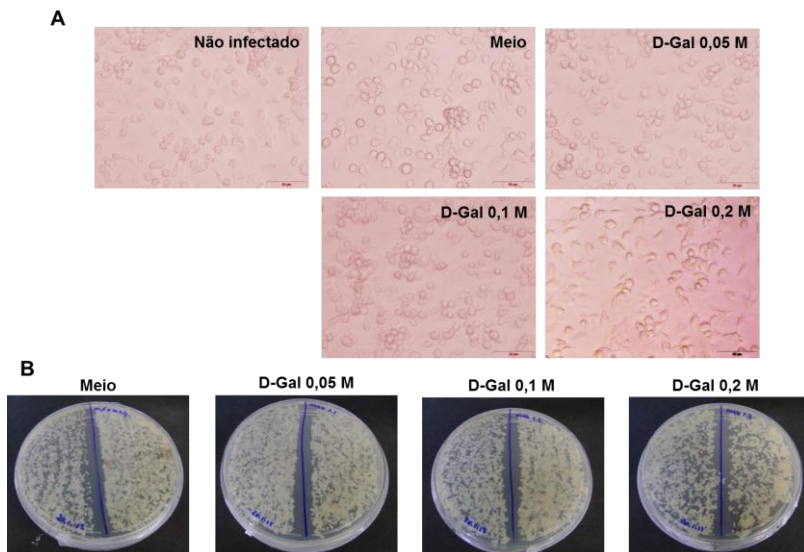


Figura 8: Aparência dos BMMs infectados e das UFCs. BMMs (2×10^5) foram infectados com *Mtb* (MOI = 1) tratados com D-Gal em diferentes concentrações (0,05, 0,1 e 0,2 M) e incubados por 18 h. (A) Microscopia óptica dos BMMs, sendo utilizados como controles, células infectadas com *Mtb* não tratado e células não infectadas. (B) Fotografia de placas de Petri contendo ágar 7H10 onde foram semeados os BMMs infectados, em duplicata, após lise com saponina 1%.

Como o TNF é uma das citocinas pró-inflamatórias produzidas em resposta à infecção pelo bacilo, acredita-se que a diminuição dos níveis desta citocina no sobrenadante dos BMMs infectados com *Mtb* tratados com D-Gal, mas não L-Gal, é consequência de uma menor infecção destas células.

Esses dados sugerem que há uma modulação na interação de proteínas ligantes de carboidratos com macrófagos. Pelo fato da D-Gal ser o carboidrato que possui afinidade pela sMTL-13, mais estudos precisam ser realizados para investigar se a entrada do bacilo no macrófago é influenciada por essa lectina.

Devido a grande importância das lectinas na interação com o sistema imune, o estudo da interação da sMTL-13 com células desse sistema torna-se uma importante ferramenta para avaliar sua imunogenicidade e o seu potencial como alvo vacinal, diagnóstico ou de tratamento.

4.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA SMTL-13 GERAR UMA RESPOSTA IMUNE ANTÍGENO-ESPECÍFICA

Neste trabalho, nós estimamos o efeito imunogênico da lectina sMTL-13 recombinante em camundongos a partir do estudo do efeito da mesma na produção de citocinas por BMDCs e também na capacidade de estimulação de células T CD4+ antígeno-específica.

A utilização de proteínas recombinantes é de grande importância na aquisição de novos conhecimentos e no desenvolvimento de novos processos na área de biotecnologia e biociências, pois sua utilização nos permite uma melhor abordagem dos estudos de estrutura, função e identificação de novas proteínas.

Para o estudo de proteínas de *Mtb* a utilização de proteínas recombinantes se torna importante, uma vez que o cultivo desta bactéria para obtenção de proteínas é lento, levando de 3 a 6 semanas, havendo a necessidade de crescimento de grande densidade bacteriana e a utilização de um nível BS3, o que torna o processo dispendioso.

O sistema mais amplamente utilizado para expressão de proteínas heterólogas é o que utiliza a enterobactéria *E. coli* como hospedeira, por ser um sistema que facilita a expressão de proteínas devido a sua simplicidade, alta capacidade de cultivo, vasto conhecimento de sua genética e o grande número de ferramentas moleculares disponíveis.

O intuito de utilizar a estratégia de expressão heteróloga de proteínas em bactérias é baseado na obtenção de grande quantidade de produto solúvel na célula hospedeira. Porém, a atividade proteica é dependente do dobramento tridimensional correto da proteína, que por sua vez é dependente do metabolismo da célula, que muitas vezes pode entrar em situação de estresse, levando ao acúmulo de proteínas em agregados insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão. A formação de corpos de inclusão em sistemas de expressão heteróloga é resultado de um desequilíbrio entre a agregação proteica e sua solubilização.

Nosso grupo caracterizou previamente a sMTL-13 e a sintetizou de forma heteróloga em *E. coli*, em corpos de inclusão (NOGUEIRA *et al.*, 2010). No entanto, a proteína foi sintetizada na sua forma inicial, com aproximadamente 17 kDa, contendo os 33 aminoácidos que codificam uma sequência hidrofóbica denominada peptídeo sinal, na sua porção N-terminal, sequência removida pelo *Mtb* para a formação da proteína

madura, com peso molecular aproximado de 13 kDa, que possui capacidade de ser secretada.

O redobramento das proteínas expressas em corpos de inclusão é, na grande maioria das vezes, indesejado. Os principais obstáculos são a escassa recuperação, a otimização de processos de redobramento dependente de cada proteína expressa e a possibilidade do redobramento afetar a integridade e atividade proteica, tornando a purificação da proteína na fração solúvel mais atrativa pelo fato de ser menos dispendiosa e com maior chance de êxito.

Dentre algumas técnicas utilizadas para tornar solúveis proteínas previamente insolúveis, existe a fusão da cauda de histidina com a fração C-terminal da proteína recombinante, estratégia que já se mostrou efetiva (GRASLUND *et al.*, 2008). Baseando-se na metodologia descrita por Patra e colaboradores (2011), nós utilizamos *E. coli* BL21 (DE3) como hospedeiro e o vetor de expressão da família pET, o pET21a, que transfere a cauda de histidina da fração N-terminal para a C-terminal.

Após purificação em coluna de agarose Ni-NTA, podemos verificar a eluição de uma proteína de 13 kDa (figura 9, colunas 9-11).

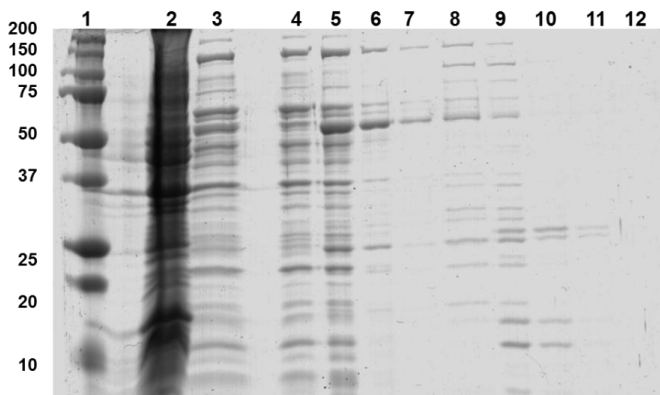


Figura 9: Purificação da sMTL-13 recombinante por Ni-NTA. A análise das frações obtidas na purificação foi feita por SDS-PAGE a 4-12%. A coluna 1 é o marcador de peso molecular da Dual Color (BioRad), a coluna 2 é a fração total do lisado bacteriano, a coluna 3 é a fração solúvel, as colunas 4-6 são frações de lavagem e as colunas 7-12 são frações de eluição. O gel foi corado por Comassie.

A confirmação da eluição da sMTL-13 foi realizada através de *Western-blot* (figura 10), onde podemos verificar que a sMTL-13 produzida heterologicamente em *E. coli*, utilizando o pET21a como vetor

de expressão, está presente na fração solúvel da bactéria, após 6 h de indução, com 1 mM de IPTG.

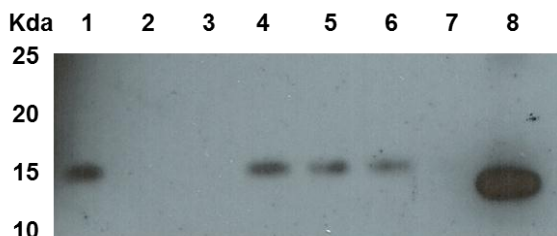


Figura 10: Análise da purificação da sMTL-13 por *Western-blot*. O anticorpo primário utilizado foi o monoclonal purificado contra a sMLT-13. A coluna 1 representa a fração solúvel, a coluna 2 e 3 as lavagens, as colunas 4-7 os eluídos 3-6 e a coluna 8 o CFP de *Mtb* H37Rv.

A proteína produzida apresentou cerca de 13 kDa de peso molecular, o que é compatível com a ausência do peptídeo sinal, tornando-a mais semelhante com aquela produzida e secretada pelo *Mtb*.

Estes dados demonstram a possibilidade de obtenção menos dispendiosa da sMTL-13, evitando os possíveis problemas existentes na produção e purificação de proteínas insolúveis.

Nosso grupo demonstrou previamente que a sMTL-13 recombinante é reconhecida por células de pacientes que sofrem de TB ativa, que por sua vez apresentam altos títulos de IgG contra essa lectina (NOGUEIRA *et al.*, 2010). Essa resposta diminui conforme o tratamento é seguido, sugerindo que a resposta imune contra a proteína diminui conforme há controle da proliferação do *Mtb*. Além disso, dados não publicados demonstram que a sMTL-13 é capaz de induzir a produção de TNF em macrófagos de linhagem J774.

Tendo em vista que a patogenicidade bacteriana depende de seus fatores de virulência, que podem estar presentes na parede celular ou muitas vezes secretados por patógenos, as lectinas tornaram-se alvo de estudos, principalmente pelos seus efeitos imunomodulatórios.

As micoses oftálmicas, causada pelo fungo *Cephalosporium* estão se tornando grande causa de cegueira, sendo a lectina mitogênica deste patógeno, conhecida como lectina do *Cephalosporium* (CSL), um fator de virulência importante para esse fungo. A CSL é capaz de se ligar fortemente a PBMCs e induzir atividade mitogênica, indicando uma possível função na adesão e infecção celular pelo *Cephalosporium* (NAGRE *et al.*, 2010).

Outras lectinas como a lectina *C. nebularis* (CNL), do fungo *Clitocybe nebularis*, e a Gal-lectin, do protozoário *Entamoeba histolytica*, apresentaram habilidade na ativação de DCs humanas e subsequente ativação da resposta tipo Th1 (IVORY e CHADEE, 2007; SVAJGER *et al.*, 2011) e a lectina HlyA, do *Vibrio cholerae*, é capaz de induzir apoptose em macrófagos (CHAKRABORTY *et al.*, 2011).

Neste trabalho, nós investigamos o efeito imunogênico da lectina sMTL-13 em camundongos. Visto que a apresentação de antígeno por APCs envolve basicamente três sinais, o reconhecimento do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) da APC pelo receptor de células T do linfócito (TCR), a expressão de moléculas coestimulatórias e a produção de citocinas, nós avaliamos o terceiro sinal, importante para o início dessa resposta e a capacidade do reconhecimento do MHC pelos TCR previamente ativadas.

A primeira resposta do organismo, frente a maior parte dos patógenos, é uma reação inflamatória, caracterizada pela migração de células, alteração da permeabilidade vascular e produção de citocinas, quimiocinas e interferons. Essas células inflamatórias representam a fase efetora da resposta inata, que por sua vez não é patógeno-específica, mas dependente do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento padrão (TRINCHIERI, 2003).

Para determinar o efeito da sMTL-13 na produção de citocinas pró-inflamatórias pelas BMDCs, obtidas conforme descrito nos Materiais e métodos, as mesmas foram estimuladas, *in vitro*, com 1 ou 10 µg/ml de sMTL-13, 1 ou 10 µg/ml de CFP ou 50 ng/ml de LPS, durante 24 h. Após o estímulo, o sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem de citocinas produzidas pelas BMDCs através da metodologia de ELISA (figura 11).

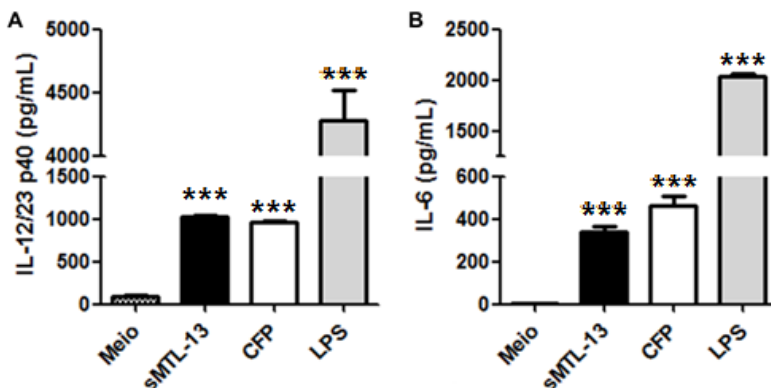


Figura 11: Produção de citocinas pró-inflamatórias por BMDCs estimuladas com sMTL-13. A dosagem de IL-12/23 p40 (A) e IL-6 (B) foi realizada no sobrenadante de cultura após o estímulo de 24h com 10 $\mu\text{g/ml}$ de CFP, sMTL-13 ou 50 ng/ml de LPS. Os valores representam a média e o desvio padrão da média de dosagens realizadas em triplicata para cada condição. Os dados apresentados estão expressos como média \pm erro padrão da média de triplicatas e representam 2 experimentos independentes; *** diferença estatística significativa ($p < 0,001$, ANOVA de uma via seguida do teste Newman-Keuls) entre os grupos comparados com o meio.

Os dados obtidos indicam que a sMTL-13, na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, foi capaz de induzir a produção tanto de IL12/23 p40 quanto de IL-6 (Figura 11A e 11B, respectivamente), quando comparado com o controle não induzido. A sMTL-13 na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ não foi capaz de induzir a produção de quantidades significativas de citocinas (dados não mostrados). O controle positivo utilizado para o teste foi o LPS.

Dados não publicados demonstraram que a sMTL-13 recombinante utilizada, em presença de polimixina B, composto que se liga ao LPS bacteriano e impede que o mesmo induza produção de citocinas pelas células, não teve a indução de citocinas por APC alterada, indicando que a proteína recombinante não está contaminada com LPS bacteriano.

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória que induz a produção de IFN- γ , que por sua vez irá favorecer a diferenciação de células da resposta Th1, tendo a habilidade de formar uma ligação entre a resposta imune inata e adaptativa. As DCs, assim como outras células fagocitárias, secretam IL-12 em resposta à infecção por patógenos (TRINCHIERI, 2003; AKDIS *et al.*, 2011).

A IL-6 está envolvida em diversos processos biológicos, tanto na resposta imune humoral quanto celular, agindo em diversos alvos celulares. Na resposta imune inata, a IL-6 é capaz de induzir o tráfico e a ativação de leucócitos além de promover a proliferação de células T (AKDIS *et al.*, 2011).

Além da produção das citocinas, outra característica importante da resposta imune adaptativa é a habilidade dos clones de linfócitos antígeno-específicos proliferarem de forma rápida e se diferenciarem em células T CD4⁺ e CD8⁺ efectoras. A ativação de linfócitos T requer o reconhecimento de antígenos apresentados por moléculas de MHC e expressão de moléculas coestimulatórias. O reconhecimento de antígenos por células T específicas resulta na ativação e expansão clonal destas células (MEDZHITOV e JANEWAY, 1998).

Para analisar a funcionalidade das BMDCs estimuladas com a sMTL-13, foi avaliada a capacidade dessas em induzir proliferação de células T CD4⁺ antígeno-específica.

As células T CD4⁺ isoladas dos linfonodos drenantes dos grupos de camundongos inoculados ou não com 10 µg de CFP, de sMTL-13 ou de Ag85 foram marcadas com CFSE, conforme descrito nos Materiais e Métodos. Essas células foram colocadas em cocultura com as BMDCs estimuladas, por 72 h. Após este período, o sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem de IFN-γ e as células foram analisadas em citometria de fluxo para a proliferação celular via diluição do CFSE.

Ao analisar a capacidade das BMDCs estimuladas em induzir proliferação de células T CD4⁺ marcadas com CFSE, pode-se observar que as BMDCs estimuladas com CFP tiveram capacidade de induzir a proliferação das células de camundongos inoculados com CFP e componentes do mesmo, como o Ag85 e a sMTL-13 (Figura 12B). Porém, ao analisar a capacidade de BMDCs estimuladas com sMTL-13 em induzir proliferação, podemos observar que houve proliferação significativa apenas quando as BMDCs estiveram em cocultura com células T CD4⁺ de camundongos inoculados com sMTL-13, sugerindo que essa lectina induz uma resposta antígeno-específicas (Figura 12A).

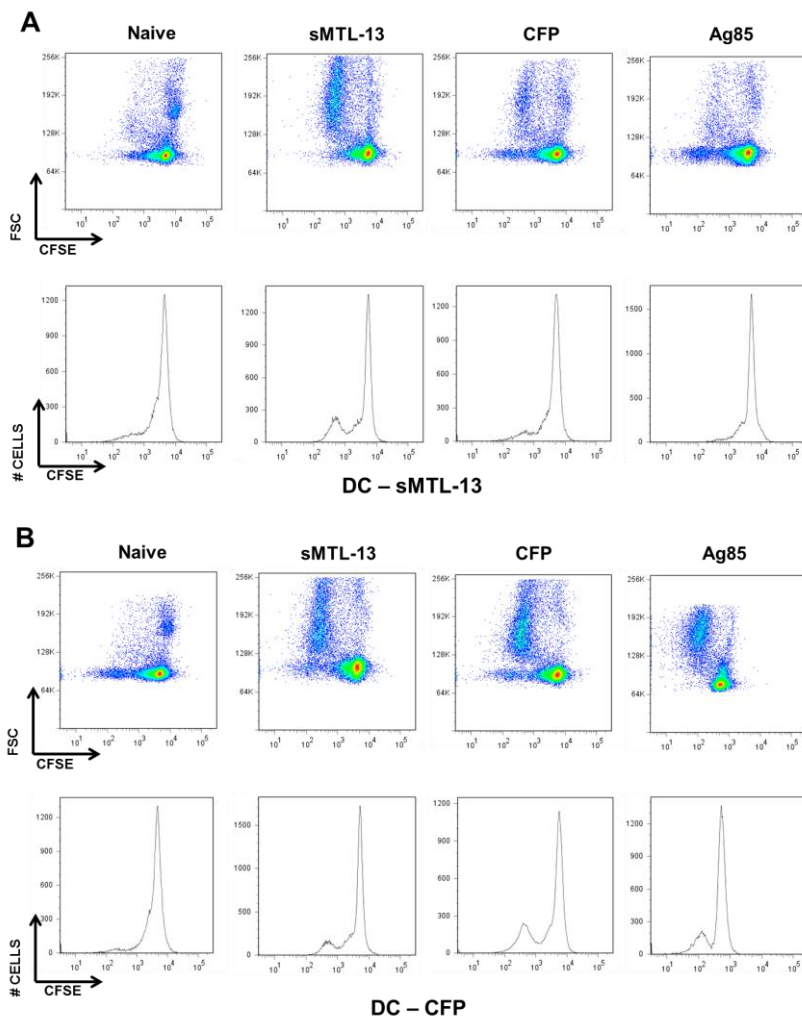


Figura 12: Proliferação de células T CD4+ frente à BMDCs estimuladas com sMTL-13. As células T CD4+ isoladas de camundongos naive e inoculadas com sMTL-13, CFP e Ag85, conforme descrito nos Materiais e Métodos, foram marcadas com CFSE e colocadas em cocultura, por 72h, com BMDCs estimuladas com 10 µg/ml de sMTL-13 (A) ou 10 µg/ml de CFP (B). A proliferação celular foi avaliada através do Dot plot da diluição do CFSE versus o tamanho das células (FSC) e através de histogramas. Os dados apresentados representam 2 experimentos independentes.

Quanto à dosagem de IFN- γ pelas células T CD4+, podemos observar que as BMDCs não estimuladas não induziram produção de IFN- γ , porém as estimuladas com sMTL-13 foram capazes de induzir a produção desta citocina tanto quanto as estimuladas com CFP. As células T CD4+ de camundongos inoculados com Ag85, componente do CFP, foram capazes de produzir IFN- γ quando em contato com BMDCs estimuladas com CFP, assim como a sMTL-13. Entretanto, quando em contato com BMDCs estimuladas com sMTL-13, essas células T CD4+ não foram capazes de secretar IFN- γ , sugerindo que a resposta das células T CD4+ de camundongos inoculados com a sMTL-13 é antígeno-específica (Figura 13).

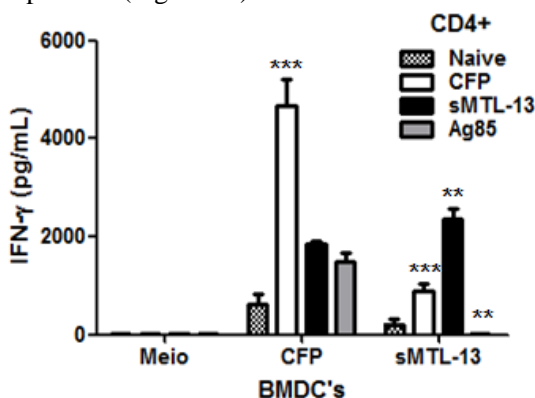


Figura 13: Produção de IFN- γ por células T CD4+ após cocultura com BMDCs. Após 72 h de cocultura, o sobrenadante de cultura foi coletado e a dosagem de IFN- γ foi realizada através de ELISA. Os valores representam a média e o desvio padrão da média de dosagens realizadas em triplicata para cada condição. Os dados apresentados estão expressos como média \pm erro padrão da média de triplicatas e representam 2 experimentos independentes; * diferença estatística significativa (** $p < 0,01$, *** $p < 000,1$, ANOVA de duas vias seguida do teste Bonferroni) dos grupos comparados com o naive.

O IFN- γ é uma citocina importante para funções antimicrobianas das células fagocitárias, tendo um papel importante na resistência às bactérias. Além disso, IFN- γ promove a ativação de linfócitos T CD4+ antígeno específicos via regulação da expressão de molécula de MHC classe II e consequentemente a apresentação de antígenos (AKDIS *et al.*, 2011).

Logo, o reconhecimento da sMTL-13 recombinante pelo sistema imune, seguido de indução e ativação de linfócitos T CD4+ antígeno-específicos são importantes no que diz respeito à resposta imune contra

a TB, sugerindo que essa lectina possa atuar como um PAMP, entretanto, mais estudos precisam ser realizados.

As proteínas secretadas têm sido alvos de estudos devido ao papel que apresentam na sobrevivência do *Mtb* e na importância para a patogênese da TB. Ao caracterizar uma nova lectina secretada de *Mtb*, através de estudos de bioinformática, nosso grupo identificou um possível antígeno importante do bacilo.

Estudos posteriores demonstraram a capacidade antigênica da sMTL-13, pelo fato de ser reconhecida por APCs e anticorpos de pacientes com ATB, além de induzir expressão de citocinas por macrófagos. Estes dados geraram perguntas acerca dos mecanismos pelos quais ocorre um reconhecimento da lectina por essas células do sistema imune.

Além de ser secretada, a sMTL-13 parece ficar ancorada na parede celular do bacilo e a importância da interação inicial dessa proteína pôde ser especulada ao se perceber um bloqueio da interação do *Mtb* com APCs na presença da D-Gal, mas não L-Gal. Esses dados sugerem uma fina regulação da intimidade de proteínas ligadoras de carboidratos com macrófagos. Entretanto, não foi definida neste estudo qual a importância relativa de sMTL-13 para os efeitos de inibição de infecção/produção citocinas por macrófagos. Experimentos para definir tal questão estão em andamento utilizando-se *Mtb* deficiente em Rv1419 (que não expressa a sMTL-13), desenvolvidos por Nogueira e colaboradores (dados não publicados).

Sendo esta lectina reconhecida por células do sistema imune e devido à capacidade da sMTL-13 em induzir produção de citocinas e proliferação de linfócitos T CD4+ antígeno-específicos in vivo, esta dissertação reforça o conceito de que esta lectina é um PAMP de *Mtb*.

Nossos dados revelam que a sMTL-13 e, talvez, outras proteínas ligadoras de D-Gal expressas na superfície do *Mtb*, possam atuar na imunoprevenção e terapia contra a TB.

5. CONCLUSÕES

1) A sMTL-13 está presente na parede celular de *Mtb* e pode participar dos passos iniciais de infecção em macrófagos.

2) A D-Gal bloqueia a interação inicial entre o *Mtb* e o macrófago, sugerindo uma regulação na interação de proteínas de *Mtb* ligantes de carboidratos com estas células.

3) A sMTL-13 é imunogênica, por ser capaz de ser reconhecida por células do sistema imune e levar a proliferação de linfócitos T CD4+ antígeno-específicos. Desta forma, a sMTL-13 pode atuar como um PAMP e possuir um potencial como candidato a imunoprevenção contra tuberculose.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, A. M. et al. Type VII secretion--mycobacteria show the way. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 11, p. 883-91, 2007.

AKDIS, M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 3, p. 701-21 e1-70, 2011.

BAFICA, A. et al. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. **J Clin Invest**, v. 115, n. 6, p. 1601-6, 2005.

BALDWIN, S. L. et al. Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines encoding secreted and non-secreted forms of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A. **Tuber Lung Dis**, v. 79, n. 4, p. 251-9, 1999.

BARKER, L. F. et al. Tuberculosis vaccine research: the impact of immunology. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 3, p. 331-8, 2009.

BARRY, C. E., 3RD. Interpreting cell wall 'virulence factors' of *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 237-41, 2001.

BRASIL. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. DIVE. Brasília: Ministério da Saúde 2008.

BRASIL. **Programa nacional de controle da tuberculose PNCT**. DIVE. Brasília: Ministério da Saúde 2009.

BRASIL. **Programa nacional de controle da tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. DIVE. Brasília: Ministério da Saúde 2010.

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 83, n. 1-3, p. 91-7, 2003.

BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 732-6, 1999.

CARPENTER, Z. K.; WILLIAMSON, E. D.; EYLES, J. E. Mucosal delivery of microparticle encapsulated ESAT-6 induces robust cell-mediated responses in the lung milieu. **J Control Release**, v. 104, n. 1, p. 67-77, 2005.

CARUSO, A. M. et al. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5407-16, 1999.

CHAKRABORTY, D. C. et al. Hemolysin induces Toll-like receptor (TLR)-independent apoptosis and multiple TLR-associated parallel activation of macrophages. **J Biol Chem**, v. 286, n. 40, p. 34542-51, 2011.

CHATTERJEE, D.; KHOO, K. H. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. **Glycobiology**, v. 8, n. 2, p. 113-20, 1998.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-44, 1998.

COOK, G. M. et al. Physiology of mycobacteria. **Adv Microb Physiol**, v. 55, p. 81-182, 318-9, 2009.

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

COURT, N. et al. Partial redundancy of the pattern recognition receptors, scavenger receptors, and C-type lectins for the long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol**, v. 184, n. 12, p. 7057-70, 2010.

DE SOUZA, G. A. et al. Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway. **J Proteomics**, v. 75, n. 2, p. 502-10, 2011.

FENG, C. G. et al. Increase in gamma interferon-secreting CD8(+), as well as CD4(+), T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**, v. 67, n. 7, p. 3242-7, 1999.

GOSWAMI, S. et al. Mycotin: a lectin involved in the adherence of *Mycobacteria* to macrophages. **FEBS Lett**, v. 355, n. 2, p. 183-6, 1994.

GRASLUND, S. et al. Protein production and purification. **Nat Methods**, v. 5, n. 2, p. 135-46, 2008.

GUERRERO, G. G.; LOCHT, C. Recombinant HBHA boosting effect on BCG-induced immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Clin Dev Immunol**, v. 2011, p. 730702, 2011.

HENDERSON, R. A.; WATKINS, S. C.; FLYNN, J. L. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol**, v. 159, n. 2, p. 635-43, 1997.

HERBST, S.; SCHAIBLE, U. E.; SCHNEIDER, B. E. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19105, 2011.

IVORY, C. P.; CHADEE, K. Activation of dendritic cells by the Gallectin of *Entamoeba histolytica* drives Th1 responses in vitro and in vivo. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 2, p. 385-94, 2007.

JACOBSON, R. L.; DOYLE, R. J. Lectin-parasite interactions. **Parasitol Today**, v. 12, n. 2, p. 55-61, 1996.

KAUFMANN, S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p. 20-30, 2001.

KAUFMANN, S. H. Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 567-77, 2010.

KAUFMANN, S. H.; HUSSEY, G.; LAMBERT, P. H. New vaccines for tuberculosis. **Lancet**, v. 375, n. 9731, p. 2110-9, 2010.

KEANE, J. et al. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infect Immun**, v. 65, n. 1, p. 298-304, 1997.

LANGERMANS, J. A. et al. Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. **Vaccine**, v. 23, n. 21, p. 2740-50, 2005.

LAUNOIS, P. et al. T cell reactivity against mycolyl transferase antigen 85 of *M. tuberculosis* in HIV-TB coinfecting subjects and in AIDS patients suffering from tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. **Clin Dev Immunol**, v. 2011, 2011.

LAUNOIS, P. et al. T cell reactivity against antigen 85 but not against the 18- and 65-kD heat shock proteins in the early stages of acquired immunity against *Mycobacterium leprae*. **Clin Exp Immunol**, v. 96, n. 1, p. 86-90, 1994.

LECHEVALIER, M. P.; LECHEVALIER, H. Chemical composition as a criterion on the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 20, n. 4, p. 435-443, 1970.

LEE, V. T.; SCHNEEWIND, O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. **Genes Dev**, v. 15, n. 14, p. 1725-52, 2001.

LIU, J. New vaccine against tuberculosis: current developments and future challenges. **Science Foundation in China**, v. 17, n. 2, 2009.

MALEN, H. et al. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Proteomics**, v. 7, n. 10, p. 1702-18, 2007.

MCKEE, A. S. et al. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? **BMC Biol**, v. 8, p. 37, 2010.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A., JR. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. **Semin Immunol**, v. 10, n. 5, p. 351-3, 1998.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A., JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-7, 1997.

MENOZZI, F. D. et al. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. **J Exp Med**, v. 184, n. 3, p. 993-1001, 1996.

MOSER, M.; MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. **Nat Immunol**, v. 1, n. 3, p. 199-205, 2000.

NAGRE, N. N. et al. Purification and characterization of a mitogenic lectin from cephalosporium, a pathogenic fungus causing mycotic keratitis. **Biochem Res Int**, v. 2010, p. 854656, 2010.

NGUYEN, L.; PIETERS, J. Mycobacterial subversion of chemotherapeutic reagents and host defense tactics: challenges in tuberculosis drug development. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, p. 427-53, 2009.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 382-8, 1994.

NOGUEIRA, L. et al. Mycobacterium tuberculosis Rv1419 encodes a secreted 13 kDa lectin with immunological reactivity during human tuberculosis. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 3, p. 744-53, 2010.

O'HAGAN, D. T.; MACKICHAN, M. L.; SINGH, M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. **Biomol Eng**, v. 18, n. 3, p. 69-85, 2001.

OLSNES, S.; PIHL, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. **Biochemistry**, v. 12, n. 16, p. 3121-6, 1973.

ORME, I. M. et al. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to Mycobacterium tuberculosis infection. **J Immunol**, v. 151, n. 1, p. 518-25, 1993.

PARIDA, S. K.; KAUFMANN, S. H. Novel tuberculosis vaccines on the horizon. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 3, p. 374-84, 2010.

PATRA, D. et al. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray studies of a secreted lectin (Rv1419) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 66, n. Pt 12, p. 1662-5, 2010.

PETERS, W.; ERNST, J. D. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes Infect**, v. 5, n. 2, p. 151-8, 2003.

PETHE, K. et al. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. **Nature**, v. 412, n. 6843, p. 190-4, 2001.

PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 6, p. 399-407, 2008.

ROTHFUCHS, A. G. et al. Dectin-1 interaction with *Mycobacterium tuberculosis* leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. **J Immunol**, v. 179, n. 6, p. 3463-71, 2007.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 1, p. 39-47, 2007.

RUSSELL, D. G.; DANT, J.; STURGILL-KOSZYCKI, S. *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. **J Immunol**, v. 156, n. 12, p. 4764-73, 1996.

SCANGA, C. A. et al. Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. **J Exp Med**, v. 192, n. 3, p. 347-58, 2000.

SHAMS, H. et al. Contribution of CD8(+) T cells to gamma interferon production in human tuberculosis. **Infect Immun**, v. 69, n. 5, p. 3497-501, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SINAN. **TUBERCULOSE: Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação.**: Sistema de Informação de Agravos de Notificação 2011.

SINHA, S. et al. Immunogenic membrane-associated proteins of *Mycobacterium tuberculosis* revealed by proteomics. **Microbiology**, v. 151, n. Pt 7, p. 2411-9, 2005.

SIQUEIRA, H. R. D. et al. O tratamento atual da tuberculose (para adolescentes e adultos) comentado. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 9, n. 6, p. 61-71, 2010.

SKJOT, R. L. et al. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. **Infect Immun**, v. 68, n. 1, p. 214-20, 2000.

SORENSEN, A. L. et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**, v. 63, n. 5, p. 1710-7, 1995.

SVAJGER, U. et al. CNL, a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis*, induces maturation and activation of dendritic cells via the toll-like receptor 4 pathway. **Immunology**, v. 134, n. 4, p. 409-18, 2011.

TIAN, T. et al. In vivo depletion of CD11c+ cells delays the CD4+ T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* and exacerbates the outcome of infection. **J Immunol**, v. 175, n. 5, p. 3268-72, 2005.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 2, p. 133-46, 2003.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H.; VAN DER MEER, J. W. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 294-309, 2002.

VERGNE, I. et al. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 11, p. 4033-8, 2005.

WHO. **Global tuberculosis control: WHO report**. Geneva, Suíça: World Health Organization 2011.

WOODWORTH, J. S.; WU, Y.; BEHAR, S. M. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8⁺ T cells require perforin to kill target cells and provide protection in vivo. **J Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8595-603, 2008.

ZAGER, E. M.; MCNERNEY, R. Multidrug-resistant tuberculosis. **BMC Infect Dis**, v. 8, p. 10, 2008.